

**Fisiología del fruto de kiwi (*Actinidia deliciosa*)
durante su desarrollo y ablandamiento:
expresión de genes asociados y su modulación
por etileno y 1-metilciclopropeno**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Natalia Ilina

Licenciada en Biología – Universidad Estatal de San Petersburgo, Rusia - 2003

Lugar de trabajo: Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis:

Gabriel O. Sozzi

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-director de Tesis:

Eduardo A. Pagano

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Granada)

Consejero de estudios:

José A. Curá

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Mar del Plata)
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

JURADO DE TESIS

Director de Tesis:

Gabriel O. Sozzi

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO:

Juan Pablo Zoffoli G.

Ingeniero Agrónomo (Pontificia Universidad Católica de Chile)
Doctor en Ciencias de la Agricultura (Pontificia Universidad Católica de Chile)

JURADO:

Ariel R. Vicente

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)
Doctor en Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO:

María Fabiana Drincovich

Bioquímica (Universidad Nacional de Rosario)
Doctora en Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario)

Fecha de defensa de la Tesis: 22 de diciembre de 2011

A mis padres, mi hermana, mi marido y mi hijo

AGRADECIMIENTOS

Es mi deseo el reconocer en primer lugar a aquellos que integran mi Comité Consejero, al Director de mi Tesis, Dr. Gabriel O. Sozzi, por su incesante guía, invaluable ayuda y útiles consejos a lo largo de estos años de trabajo. A mi Co-Director, Dr. Eduardo A. Pagano, por la confianza, el estímulo y el tiempo brindado. A mi Consejero de Estudios, Dr. José A. Curá, por debatir ideas y suministrar certeras recomendaciones en momentos precisos. A todos ellos les agradezco su paciencia, sabiduría y compromiso con que me acompañaron desde el principio hasta final de este difícil camino de doctorado.

Al Lic. Gustavo Trincherro, por estar siempre dispuesto a escuchar, compartir sus opiniones y ofrecer su colaboración.

A mis compañeros de la cátedra de Bioquímica que se transformaron en amigos a lo largo de estos cinco años, esencialmente: a Alina, Caro, Patri, Vero, Jesi y Andrés, por su importante ayuda con los muestreos y mediciones de etileno, por el amparo con el análisis estadístico de datos y la comprensión de trabajar rodeados de cajones de kiwis durante meses. Les agradezco por atravesar juntos los problemas de biología molecular, por estar siempre dispuestos de dar una mano con los geles y por su gran colaboración con las correcciones de mi tesis. A Meli, Sil, Matias, Verito, Dani T., Pedro, Lucia, Agus, Yuyo, Fran, Dani R., Claudia, Juan, Alberto, Vane y Javi, por la contención y ayuda en las situaciones difíciles, por sus bromas y risas que transformaban en llevaderos momentos ásperos.

A los integrantes de la cátedra de Fruticultura, a Hubert y Fortunato, por las recomendaciones respecto al trabajo con árboles, plántulas y frutos de kiwi. A Gloria y Soledad por compartir lindos momentos en la cátedra y en las cursadas.

Al Dr. Marcelo Soria, por su contribución con la construcción del árbol filogenético.

Al CONICET, FAUBA y EPG por el apoyo económico e institucional.

A mis suegros, tíos, tías, cuñadas, cuñados, sobrinos y amigos ucranianos que siempre me han prestado un gran soporte moral y anímico.

A mis padres Tamara y Serguey, y a mi hermana Sasha, por apoyarme y por creer siempre en mí, por transmitirme su amor y alegría, por alentarme en momentos difíciles aun desde la distancia.

Finalmente, solo me resta agradecer a mi marido, Alejandro, por su paciencia, comprensión, ayuda, constante estímulo y solidaridad con este proyecto. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito... ¡gracias mi amor!

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta Tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una Tesis en ésta u otra institución”.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Trabajo publicado:

Ilina, N., Alem, H.J., Pagano, E.A. and Sozzi, G.O. 2010. Suppression of ethylene perception after exposure to cooling conditions delays the progress of softening in 'Hayward' kiwifruit. **Postharvest Biology and Technology**. 55 (3): 160-168. Elsevier. ISSN 0925-5214.

Trabajo en preparación:

Ilina, N., Di Santo, C. M., Pagano, E.A. and Sozzi, G.O. 2011. β -D-Galactosidase, α -L-arabinofuranosidase, pectate lyase and expansin genes: expression analysis in developing and ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*).

Publicaciones de secuencias en el GenBank:

Ilina, N., Di Santo, M.C., Curzi, M.J., Crelier, A.M., Alem, H.J., Sozzi, G.O., Pagano, E.A. 2006. *Actinidia deliciosa* actin mRNA, partial CDs. GenBank accession number DQ682826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI, Bethesda, Maryland, USA.

Ilina, N., Sozzi, G.O., Pagano, E.A. 2010. *Actinidia deliciosa* beta-D-galactosydase (*AdGALI*) mRNA, complete CDs GenBank accession number HQ108111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI, Bethesda, Maryland, USA.

Ilina, N., Sozzi, G.O., Pagano, E.A. 2010. *Actinidia deliciosa* alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase (*AdARF/XYLI*) mRNA, partial CDs. GenBank accession number HQ108113. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI, Bethesda, Maryland, USA.

Ilina, N., Sozzi, G.O., Pagano, E.A. 2010. *Actinidia deliciosa* alpha-L-arabinofuranosidase (*AdARFI*) mRNA, partial CDs. GenBank accession number HQ108110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI, Bethesda, Maryland, USA.

Ilina, N., Sozzi, G.O., Pagano, E.A. 2010. *Actinidia deliciosa* pectate lyase (*AdPLI*) mRNA, partial CDs. GenBank accession number HQ108112 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCBI, Bethesda, Maryland, USA.

INDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DECLARACIÓN.....	iv
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	v
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xix
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El problema de la conservación de frutos.....	1
1.2. La actinidia: características generales del género, de su fruto y de su producción.....	1
1.3. Crecimiento y desarrollo de los frutos: el caso del kiwi	4
1.4. La maduración de los frutos climatéricos: el caso del kiwi.....	6
1.5. El etileno y la maduración de los frutos	8
1.5.1.Los receptores del etileno	9
1.5.2.El etileno y el ablandamiento de los frutos: el caso del kiwi	11
1.5.3.Los inhibidores de la acción del etileno: el 1-MCP	13
1.5.4.El 1-MCP en kiwi	15
1.6. Estructura, composición y metabolismo de la pared celular	17
1.6.1.Principales componentes de la pared celular	18
1.6.2.Metabolismo de la pared celular durante la maduración de los frutos....	22
1.6.3.Los cambios de la pared celular durante la maduración del kiwi	23

1.6.4.Principales proteínas con o sin actividad enzimática demostrada que modifican polímeros de la pared celular	24
1.6.5.Características generales de las α -L-arabinofuranosidasas y β -D-galactosidasas.....	28
1.6.6.Características generales de las pectato liasas	30
1.6.7.Características generales de las expansinas.....	31
1.7. Hipótesis de trabajo y objetivos	34
1.7.1.Hipótesis	34
1.7.2.Objetivo General	34
1.7.3.Objetivos Específicos	35
CAPÍTULO 2	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.1. Material vegetal.....	36
2.2. Experimentos	37
2.2.1.Experimento 1: Aplicación de 1-MCP o de etileno con posterior almacenamiento de los frutos a 20 °C. Evaluación de la producción de etileno, la firmeza y la expresión de los genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> y <i>KWACOI</i>	37
2.2.2.Experimento 2: Aplicación de 1-MCP después de 40, 80 o 120 días de conservación a 0 °C y posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la producción de etileno, la firmeza y la expresión de los genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> y <i>KWACOI</i>	39
2.2.3.Experimento 3: Aplicación de 1-MCP después de 40 y 80 días de conservación a 0 °C y posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la producción de etileno, la firmeza y la expresión de los genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> y <i>KWACOI</i>	39
2.2.4.Experimento 4: Obtención de las secuencias de <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>Actina</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i>	40
2.2.4.1.Obtención de la secuencia completa del gen <i>AdGAL1</i>	40
2.2.4.2.Obtención de la secuencia parcial del gen <i>AdARF/XYL1</i>	42
2.2.4.3.Obtención de la secuencia parcial del gen <i>AdARF1</i>	43
2.2.4.4.Obtención de la secuencia parcial del gen <i>AdPL1</i>	43
2.2.4.5.Obtención de la secuencia parcial del gen <i>Actina</i>	44
2.2.4.6.Secuencias de los genes <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i>	45

2.2.5.Experimento 5: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> durante el crecimiento y desarrollo de los frutos	45
2.2.6.Experimento 6: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en frutos durante el período de postcosecha y su vinculación con los niveles de firmeza y de producción de etileno	46
2.2.7.Experimento 7: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en frutos tratados con etileno y con 1-MCP, y su vinculación con los niveles de firmeza	47
2.2.8.Experimento 8: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en órganos florales y tejidos vegetativos.....	47
2.3. Métodos	48
2.3.1.Medición de los índices físicos del fruto	48
2.3.2.Medición de producción de etileno y determinación de firmeza	48
2.3.3.Muestreos de material vegetal	48
2.3.4.Extracción de ARNm	49
2.3.5.Cuantificación de ARNm y ADN	51
2.3.6.Síntesis de ADNc	51
2.3.7.RT-PCR	52
2.3.8.Reacciones semicuantitativas de RT-PCR	52
2.3.9.Condiciones de PCR para los genes <i>KWACS1</i> , <i>KWACS2</i> , <i>KWACO1</i> , <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> , <i>AdEXP2</i> y <i>Actina</i>	53
2.3.10.Secuencias de ‘primers’	54
2.3.11.Amplificación rápida de los extremos 5’ de ADNc (RACE 5’)	56
2.3.12.Amplificación rápida de los extremos 3’ de ADNc (RACE 3’)	59
2.3.13.Electroforesis de ADN en geles de agarosa	61
2.3.14.Visualización de los productos de PCR.....	61
2.3.15.Extracción de ADN de geles de agarosa.....	62
2.3.16.Ligación de los productos purificados de PCR.....	63
2.3.17.Obtención de células competentes.....	63
2.3.18.Transformación de células competentes	64
2.3.19.PCR sobre colonias.....	65

2.3.20. Aislamiento de ADN plasmídico	65
2.3.21. Secuenciación y análisis bioinformático.....	66
2.3.22. Construcción del árbol filogenético.....	66
2.3.23. Análisis estadístico	67
2.3.24. Números de acceso GenBank.....	67
CAPÍTULO 3	69
RESULTADOS	69
3.1. Experimento 1: Aplicación de 1-MCP o de etileno con posterior almacenamiento a 20 °C y evaluación de producción de etileno, firmeza y expresión de genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> y <i>KWACOI</i>	69
3.2. Experimento 2: Aplicación de 1-MCP después de 40, 80 o 120 días de conservación a 0 °C con posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la firmeza y de la expresión de los genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> y <i>KWACOI</i>	73
3.3. Experimento 3: Aplicación doble de 1-MCP después de 40 y 80 días de conservación a 0 °C y posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la firmeza y de la expresión de los genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> y <i>KWACOI</i>	78
3.4. Experimento 4: Obtención y análisis de las secuencias de <i>AdGALI</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> y <i>Actina</i>	81
3.4.1. Obtención y análisis de la secuencia completa del gen <i>AdGALI</i>	81
3.4.1.1. Secuencia de <i>AdGALI</i> y su análisis bioinformático	81
3.4.1.2. Análisis filogenético de <i>AdGALI</i>	85
3.4.2. Obtención y análisis de la secuencia parcial del gen <i>AdARF/XYL1</i>	87
3.4.3. Obtención y análisis de la secuencia parcial del gen <i>AdARF1</i>	88
3.4.4. Obtención y análisis de la secuencia parcial del gen <i>AdPL1</i>	89
3.4.5. Obtención y análisis de la secuencia parcial de <i>Actina</i>	90
3.5. Experimento 5: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGALI</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> durante el crecimiento y desarrollo de los frutos.....	90
3.6. Experimento 6: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGALI</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en kiwis durante el período de postcosecha y su vinculación con los niveles de firmeza y de producción de etileno.....	95

3.7. Experimento 7: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en frutos tratados con etileno y con 1-MCP, y su vinculación con los niveles de firmeza	97
3.8. Experimento 8: Evaluación de la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en órganos florales y tejidos vegetativos.....	99
CAPÍTULO 4	101
DISCUSIÓN.....	101
4.1. Los resultados de la aplicación de 1-MCP en kiwi dependen fuertemente de las características de la región de origen de los frutos.....	101
4.2. El 1-MCP es un inhibidor capaz de retardar la pérdida de firmeza del kiwi, aún después de largos períodos de conservación en frío y en estados de ablandamiento avanzados.....	103
4.3. El 1-MCP produce un bloqueo en la expresión de los genes <i>KWACS1</i> y <i>KWACO1</i> de kiwi	108
4.4. Análisis de secuencia in silico del gen <i>AdGAL1</i>	111
4.5. La expresión génica de <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> durante la ontogenia del kiwi puede vincularse con los cambios que se producen en la pared celular.....	112
4.5.1.Expresión de <i>AdGAL1</i> durante la ontogenia.....	114
4.5.2.Expresión de <i>AdARF/XYL1</i> y <i>AdARF1</i> durante la ontogenia	117
4.5.3.Expresión de <i>AdPL1</i> durante la ontogenia	119
4.5.4.Expresión de <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> durante la ontogenia.....	120
4.6. La expresión génica de <i>AdGAL1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> durante la maduración del kiwi guarda relación con las principales modificaciones de la pared celular observadas durante el ablandamiento	122
4.6.1.Variación de la firmeza	122
4.6.2.Comparación cronológica de la expresión génica durante la maduración.....	123
4.6.2.1.Estadio 1.....	123
4.6.2.2.Estadio 2.....	126
4.6.2.3.Estadio 3.....	127

4.7. La expresión génica de <i>AdEXP1</i> , <i>AdEXP2</i> , <i>AdGAL1</i> y <i>AdPL1</i> durante la maduración del kiwi es modulada por el etileno, pero manifestando diferencias en los niveles, tiempos y formas de respuesta	128
4.7.1. Variación de la firmeza	128
4.7.2. Modulaciones de expresión génica por etileno	128
4.8. Expresión génica de <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en otros tejidos	133
CAPÍTULO 5	135
CONCLUSIONES GENERALES.....	135
5.1. Comprobación de las hipótesis y resultados principales	135
5.2. Contribuciones de esta Tesis: relevancia para el estado actual del conocimiento	139
5.3. Perspectivas	142
BIBLIOGRAFIA	144

INDICE DE CUADROS

	Página
CAPITULO 2:	
Cuadro 2.1 Variaciones del programa de la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR para los genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> , <i>KWACO1</i> , <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> , <i>AdEXP2</i> y <i>Actina</i>	54
Cuadro 2.2 ‘Primers’ utilizados para RT-PCR, con el detalle de su utilidad específica.	55
Cuadro 2.3 ‘Primers’ utilizados para la medición de transcritos de ARNm de los genes <i>KWACSI</i> , <i>KWACS2</i> , <i>KWACO1</i> , <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> , <i>AdEXP2</i> y <i>Actina</i>	56
Cuadro 2.4 Los números de acceso del GenBank de genes citados en este trabajo.	68
CAPITULO 3:	
Cuadro 3.1 Porcentaje de identidad de <i>AdGAL1</i> en relación a las secuencias de genes codificantes de β -Gal de otros frutos.	83
Cuadro 3.2 Porcentaje de identidad de <i>AdARF/XYL1</i> en relación a las secuencias de genes codificantes de α -Ara/ β -Xil de otros frutos.	88
Cuadro 3.3 Porcentaje de identidad de <i>AdARF1</i> en relación a las secuencias de genes codificantes de α -Ara de otros frutos.	88
Cuadro 3.4 Porcentaje de identidad de <i>AdPL1</i> en relación a las secuencias de genes codificantes de PL de otros frutos.	89
Cuadro 3.5 Porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos de <i>Actina</i> en relación a las secuencias de actina de otros frutos.	90
CAPITULO 5:	
Cuadro 5.1 Vinculación entre las distintas fases del crecimiento y desarrollo del kiwi, algunos eventos metabólicos de su pared celular y la expresión de genes potencialmente relacionados.	140
Cuadro 5.2 Estado del conocimiento de la posible dependencia del etileno de genes vinculados a la pared celular.	141

INDICE DE FIGURAS

	Página
 CAPITULO 1:	
Figura 1.1 Estructura de kiwi de la especie <i>A. deliciosa</i>	2
Figura 1.2 Modelo tridimensional de la estructura de la pared celular tipo I.	19
 CAPITULO 2:	
Figura 2.1 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia completa de <i>AdGAL1</i>	41
Figura 2.2 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen <i>AdARF/XYL1</i>	42
Figura 2.3 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen <i>AdARF1</i>	43
Figura 2.4 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen <i>AdPL1</i>	44
Figura 2.5 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen de <i>Actina</i>	45
Figura 2.6 Representación esquemática de los pasos de la técnica RACE 5’.....	57
Figura 2.7 Representación esquemática de los pasos de la técnica RACE 3’.....	60
 CAPITULO 3:	
Figura 3.1 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis cosechados en Mar del Sur.....	70
Figura 3.2 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis cosechados en Baradero.....	71
Figura 3.3 Acumulación de transcritos de <i>KWACS1</i> , <i>KWACS2</i> y <i>KWACO1</i> en el mesocarpio y la columela de los frutos de Mar del Sur en el Experimento 1.	72
Figura 3.4 Producción de etileno (A) y firmeza (B) de frutos conservados a 0 °C durante 40 d y después tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$	74

Figura 3.5 Acumulación de transcritos de <i>KWAC1</i> , <i>KWAC2</i> y <i>KWACO1</i> en el mesocarpio y en la columela de los frutos conservados a 0 °C durante 40 d y luego tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$	75
Figura 3.6 Producción del etileno (A) y firmeza (B) en kiwis conservados a 0 °C durante 80 d y después tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$	76
Figura 3.7 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis conservados a 0 °C durante 120 d y después tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$	77
Figura 3.8 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis conservados a 0 °C durante 80 d y luego tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ después de 40 d y después de 80 d de conservación a 0 °C.	79
Figura 3.9 Acumulación de transcritos de <i>KWAC1</i> , <i>KWAC2</i> y <i>KWACO1</i> en el mesocarpio y en la columela en los frutos tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ después de 40 d y después de 80 d de conservación a 0 °C.	80
Figura 3.10 Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de <i>AdGAL1</i>	82
Figura 3.11 Fragmento de alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de <i>AdGAL1</i> (<i>Actinidia deliciosa</i>), <i>TBG4</i> (<i>Lycopersicon esculentum</i>), <i>PpGAL1</i> (<i>Prunus persica</i>), <i>CsGAL1</i> (<i>Citrus sinensis</i>), <i>JP-GAL</i> (<i>Pyrus pyrifolia</i>), <i>PcGAL1</i> (<i>Pyrus communis</i>) y <i>pABG1</i> (<i>Malus x domestica</i>) mediante el programa ClustalW.	84
Figura 3.12 Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de β -Gal de plantas construido mediante el programa MEGA 4.	86
Figura 3.13 Secuencia parcial de nucleótidos de <i>AdARF/XYL1</i> (1928 pb).	87
Figura 3.14 Secuencia parcial de nucleótidos de <i>AdARF</i> (284 pb).	88
Figura 3.15 Secuencia parcial de nucleótidos de <i>AdPL1</i> (710 pb).	89
Figura 3.16 Secuencia parcial de nucleótidos de <i>Actina</i> de kiwi (245 pb).	90
Figura 3.17 Variación del peso fresco durante el crecimiento y el desarrollo del kiwi.	91
Figura 3.18 Variación del tamaño de los frutos durante el crecimiento y el desarrollo del kiwi.	92
Figura 3.19 Expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en el mesocarpio durante el crecimiento y desarrollo del kiwi.	93

Figura 3.20 Expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en la columela durante el crecimiento y desarrollo del kiwi.	94
Figura 3.21 Variaciones de firmeza y de producción de etileno durante el período de almacenamiento de los frutos a 20 ± 2 °C después de cosecha en el Estadio 2 de maduración.	95
Figura 3.22 Expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en el mesocarpo y en la columela durante el período de almacenamiento de los frutos a 20 ± 2 °C, después de su cosecha en el Estadio 2 de maduración.	96
Figura 3.23 Efecto del etileno exógeno y del 1-MCP sobre la firmeza de los frutos....	98
Figura 3.24 Efecto del etileno exógeno y del 1-MCP sobre la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en el mesocarpo de kiwi.	99
Figura 3.25 Variación de la expresión de los genes <i>AdGAL1</i> , <i>AdARF/XYL1</i> , <i>AdARF1</i> , <i>AdPL1</i> , <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> en órganos florales (sépalos, pétalos, estilos, estambres, ovarios), raíces y hojas jóvenes de plántulas.	100

ABREVIATURAS

ADNc	ADN copia
ACO	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa
ACS	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa
α -Ara	α -L-Arabinofuranosidasa(s)
α -Ara/ β -Xil	α -L-Arabinofuranosidasa/ β -D-Xilosidasa (s)
ARNm	ARN mensajero
DEPC	Dietil pirocarbonato
EGasa	Endo-(1,4) β -D-glucanasa(s)
Exp	Expansina (s)
EXPA	α -Expansinas
EXPB	β -Expansinas
EXPLA	Expansinas tipo A
EXPLB	Expansinas tipo B
β -Gal	β -D-Galactosidasa(s)
HG	Homogalacturonano
1-MCP	1-metilciclopropeno
PCR	Reaccion en cadena de polimerasa
PG	Poligalacturonasa(s)
PL	Pectato liasa(s)
PME	Pectin metilesterasa(s)
RG I	Ramnogalacturonano I
RG II	Ramnogalacturonano II
rpm	Revoluciones por minuto
XET	Xiloglucano endotransglicosilasa(s)
β -Xil	β -D-Xilosidasa(s)

RESUMEN

FISIOLOGÍA DEL FRUTO DE KIWI (*ACTINIDIA DELICIOSA*) DURANTE SU DESARROLLO Y ABLANDAMIENTO: EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS Y SU MODULACIÓN POR ETILENO Y 1-METILCICLOPROPENO

A fin de investigar el efecto fisiológico del etileno y del 1-metilciclopropeno en el progreso del ablandamiento del kiwi, se trató los frutos con esos reguladores inmediatamente después de la cosecha, o con 1-metilciclopropeno en diferentes estadios de la maduración después de 40, 80 o 120 d de almacenamiento refrigerado (0 °C). El tratamiento con etileno inmediatamente después de la cosecha estimuló el ablandamiento de la pulpa, incrementó y adelantó el pico de producción de etileno y la expresión de los genes *KWACSI* y *KWACOI* involucrados en la biosíntesis del etileno. En cambio, el tratamiento con 1-metilciclopropeno en el mismo estadio retrasó marcadamente el ablandamiento e inhibió la producción de etileno. Los incrementos en la abundancia de transcritos de *KWACSI* y *KWACOI* fueron bloqueados por el tratamiento con 1-metilciclopropeno, indicando que estos genes son regulados positivamente por el etileno. Los kiwis almacenados en frío (0 °C) por 40, 80 o 120 d y luego tratados con 1-metilciclopropeno antes de su retorno a 20 °C para su maduración ulterior mostraron una tasa reducida de ablandamiento de la pulpa y un estadio de madurez de consumo extendido. Estos resultados indican claramente que la aplicación de 1-metilciclopropeno puede jugar un papel significativo en el inicio y en el progreso del ablandamiento del kiwi. El 1-metilciclopropeno inhibió o restringió severamente la producción autocatalítica de etileno en cualquier estado de maduración. La transcripción de los genes *KWACSI* y *KWACOI* resultó inhibida por el tratamiento con 1-metilciclopropeno después de 40 y 80 d de almacenamiento en frío, sugiriendo que existe una regulación por retroalimentación positiva para la producción de etileno, incluso después del almacenamiento refrigerado. Para investigar los niveles de expresión de genes relacionados con la pared celular durante la ontogenia del kiwi y en respuesta a la aplicación de etileno y de 1-metilciclopropeno, se obtuvo una secuencia completa de cDNA a la cual se denominó *AdGAL1*, determinándose por análisis bioinformático que es un homólogo de β -D-galactosidasa de kiwi. El producto deducido de la traducción de *AdGAL1* consta de 728 aminoácidos de longitud mientras que la

proteína madura posee una masa molecular predicha de 81,12 kDa y un pI teórico de 7,5. Se efectuaron reacciones de RT-PCR semicuantitativas para evaluar la expresión de *AdGAL1* y de una serie de secuencias de ADN. Los transcriptos que hibridizan con *AdGAL1* resultaron apenas detectables durante el crecimiento del fruto pero se observaron tanto en mesocarpio externo como en columela al comienzo del ablandamiento del fruto (Fase IV, Estadio 1), y durante el ablandamiento tardío (Estadio 3) sugiriendo su injerencia en las grandes pérdidas de galactosa de la pared celular durante el ablandamiento del kiwi. La abundancia de transcriptos que hibridizan con *AdARF1* y *AdARF/XYL* (codificantes de α -L-arabinofuranosidasa y de α -L-arabinofuranosidasa/ β -D-xilosidasa putativas) permaneció relativamente constante a través de todo el crecimiento y la maduración. Por el contrario, los niveles de transcriptos de *AdPL1* (codificante de una pectato liasa putativa) fueron relativamente elevados en la Fase I y IV, alcanzando un máximo cuando la firmeza del fruto fue < 10 N (Fase IV, Estadio 3) sugiriendo la intervención de *AdPL1* en la degradación de la pared celular que alcanza su pico en el último estadio de ablandamiento. Los transcriptos que hibridizan con *AdEXP1* y *AdEXP2* (codificantes de dos diferentes expansinas) se encontraron en las fases de expansión celular durante el desarrollo del kiwi, pero se incrementaron en el primero y último estadio de ablandamiento (Fase IV, Estadios 1 y 3) cuando la dilatación de la pared celular y la producción autocatalítica de etileno son máximas. El tratamiento del kiwi con etileno resultó en una disminución severa de la firmeza del fruto luego de 24-48 h y un inicio de acumulación de transcriptos que hibridizan con *AdEXP1* (en 3 h), *AdGAL1* (en 3-6 h), *AdPL1* (en 24 h) y, un aumento en *AdEXP2*. Lo contrario resultó cierto para frutos tratados con 1-metilciclopropeno, aunque la inhibición de la acumulación de transcriptos que hibridizan con *AdEXP2* por 1-metilciclopropeno fue sólo transitoria. Estos resultados indican que el incremento en la expresión de *AdGAL1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* al finalizar la maduración del fruto es, al menos en parte, debido a la regulación positiva por etileno.

Palabras clave: *Actinidia deliciosa*; Etileno; 1-Metilciclopropeno; Firmeza; Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa y oxidasa; β -D-Galactosidasa; α -L-Arabinofuranosidasa; α -L-Arabinofuranosidasa/ β -D-xilosidasa; Pectato liasa; Expansinas.

ABSTRACT

KIWIFRUIT (*ACTINIDIA DELICIOSA*) PHYSIOLOGY DURING DEVELOPMENT AND SOFTENING: GENE EXPRESSION AND ITS MODULATION BY ETHYLENE AND 1-METHYLCYCLOPROPENE

To investigate the physiological effect of ethylene and 1-methylcyclopropene in the progress of kiwifruit softening, fruit were treated with those regulators right after harvest or with 1-methylcyclopropene at different ripening stages after 40, 80 or 120 d of cold (0 °C) storage. Treatment with ethylene right after harvest stimulated flesh softening, increased and advanced the ethylene production peak and the expression of the genes *KWACSI* and *KWACOI* involved in ethylene biosynthesis. In contrast, treatment with 1-methylcyclopropene at the same stage markedly retarded softening, and inhibited ethylene production. Ripening-related increases in *KWACSI* and *KWACOI* transcript abundance were largely blocked by 1-methylcyclopropene treatment thus indicating that these genes are positively regulated by ethylene. Kiwifruit stored for 40, 80 or 120 d of cold (0 °C) storage and then treated with 1-methylcyclopropene before rewarming to 20 °C for further ripening displayed a reduced flesh softening rate and an extended ‘eating ripe’ stage. These results clearly indicate that application of 1-methylcyclopropene can play a significant role in both the initiation and progress of the kiwifruit softening process. 1-Methylcyclopropene inhibited or severely decreased autocatalytic ethylene production at every ripening stage. *KWACSI* and *KWACOI* gene transcription was inhibited by 1-methylcyclopropene treatment after 40 and 80 d of cold storage thus suggesting that there is a positive feedback regulation for ethylene production even after cold storage.

To investigate cell wall-related gene expression levels during kiwifruit ontogeny and in response to ethylene and 1-methylcyclopropene, a full-length cDNA clone sequence referred to as *AdGALI* was obtained and determined by bioinformatics’ analysis to be a kiwifruit β -D-galactosidase homologue. The deduced *AdGALI* translation product is 728 amino acids in length while the mature protein has a predicted molecular mass of 81, 12 kD and a theoretical pI of 7,5. Semi-quantitative RT-PCR reactions were conducted to evaluate the expression of *AdGALI* and a series of DNA sequences. Transcripts hybridizing with *AdGALI* were hardly detectable during fruit growth but were observed

both in the outer mesocarp and in the columella at the onset of fruit softening (Phase IV, Stage 1), and late in softening (Stage 3), supporting their involvement in the major cell wall galactose losses that take place during kiwifruit softening. The abundance of transcripts hybridizing with *AdARF1* and *AdARF/XYL* (encoding putative α -L-arabinofuranosidase and α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase), was relatively constant throughout development and ripening. In contrast, *AdPL1* (encoding a putative pectate lyase) transcript levels were relatively high at Phase I and IV, reaching a maximum when fruit firmness was < 10 N (Phase IV, Stage 3), suggesting *AdPL1* involvement in the pectin degradation of the cell wall that peaks in the last softening stage. Transcripts hybridizing with *AdEXP1* and *AdEXP2* (encoding two different putative expansins) were found at the cell expansion phases during kiwifruit development but increased in the first and last softening stages (Phase IV, Stages 1 and 3) when cell wall swelling and autocatalytic ethylene production are maximal. Ethylene treatment of kiwifruit resulted in a severe decrease of fruit firmness after 24-48 h and beginning of transcript accumulation hybridizing with *AdEXP1* (in 3 h), *AdGAL1* (in 3-6 h), *AdPL1* (in 24 h) and, to a lesser extent, *AdEXP2*. The converse was true for fruit treated with 1-methylcyclopropene, although the inhibition of the accumulation of transcripts hybridizing with *AdEXP2* by 1-methylcyclopropene was only transient. These results indicate that *AdGAL1*, *AdPL1*, *AdEXP1* and *AdEXP2* increase in their expression at the end of fruit ripening is, at least in part, due to up-regulation by ethylene.

Keywords: *Actinidia deliciosa*; Ethylene; 1-Methylcyclopropene; Firmness; 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and oxidase; β -D-Galactosidase; α -L-Arabinofuranosidase; α -L-Arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase; Pectate lyase; Expansins.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. El problema de la conservación de frutos

Los frutos se cuentan entre los alimentos con mayor cantidad de nutrientes y sustancias naturales altamente beneficiosas para la salud, tales como las vitaminas, los minerales, los antioxidantes y las fibras. La calidad de los frutos está determinada por una amplia gama de características deseadas, como el valor nutritivo, el sabor, la calidad durante y luego del procesamiento y la vida útil. La manipulación del rendimiento y la calidad de los frutos requieren de la comprensión de los procesos fundamentales que determinan el cuaje, el crecimiento y la maduración. A su vez el mejoramiento en la calidad de los frutos beneficia tanto al consumidor, como al productor, reduciendo las pérdidas comerciales. Para los productores, acopiadores y transportistas, el factor principal que determina el deterioro en postcosecha es la pérdida de firmeza, ya que influye en la vida útil del fruto, en los niveles de las mermas producidas tanto por ablandamiento excesivo cuanto por los daños mecánicos y las infecciones generadas por los agentes patógenos. Todos estos factores acotan las posibilidades de transporte y de almacenamiento de los frutos y, además, afectan directamente la estructura de los costos. El control del deterioro por la introducción de ciertas técnicas de biología molecular, como la supresión de algunos genes codificantes de enzimas que participan en la degradación de pared celular, podría potencialmente incorporar un valor significativo a los frutos, mejorando su calidad y reduciendo su deterioro, con el consiguiente impacto a nivel comercial.

1.2. La actinidia: características generales del género, de su fruto y de su producción

La actinidia [*A. deliciosa* (A.Chev.) C. F. Liang & A.R. Ferguson] es una planta trepadora de hoja caduca y flores dioicas, que pertenece al género *Actinidia*. Este género está compuesto por 76 especies y alrededor de 120 taxones (Ferguson y Huang, 2007).

Sin embargo los miembros más importantes desde el punto de vista económico son dos: *A. deliciosa* var. *deliciosa* y *A. chinensis* Planch. var. *chinensis*, mientras que otras especies tienen relevancia como recurso genético para el desarrollo del cultivo utilizando técnicas específicas de hibridación (Nishiyama, 2007).

A. deliciosa - los frutos de esta especie tienen epicarpo marrón sin brillo y una capa de pelusa densa. Su mesocarpio externo o pulpa es de color verde esmeralda, el mesocarpio interno contiene la semillas negras y la parte central de columela blanca (Figura 1.1).

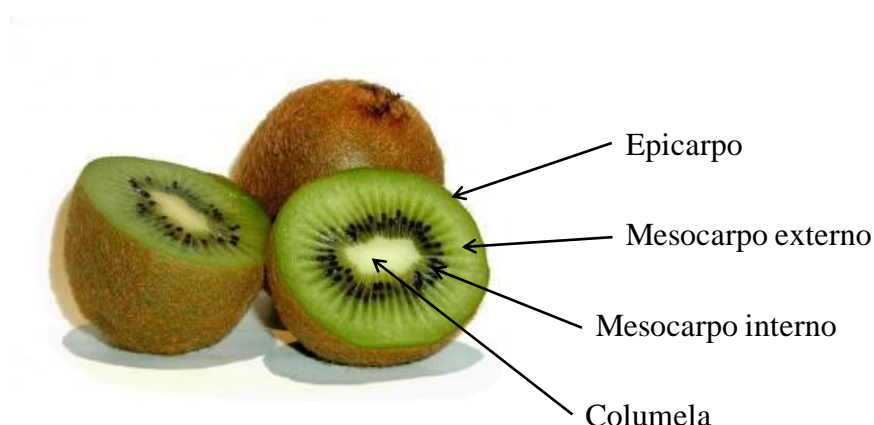


Figura 1.1 Estructura de kiwi de la especie *A. deliciosa*.

El cultivar femenino (es decir, con flores pistilíferas) más frecuente de esta especie a nivel comercial es ‘Hayward’. Los frutos maduros tienen un balance de azúcar-ácido moderado y su sabor está considerado como agrisado y muy refrescante. Las ventajas más importantes de este cultivar son el mayor tamaño de sus frutos (que alcanzan promedios de 90-100 g) y su excepcionalmente larga vida de almacenamiento, la cual hace viable la realización de traslados hacia destinos distantes mediante viajes navales prolongados. Los más notables progresos de la industria podrían ser atribuidos al éxito de ‘Hayward’ (Ferguson, 1999), que representa aproximadamente el 75% de la producción mundial de kiwi y el 97,5% de la producción generada fuera de China.

Otras variedades cultivadas femeninas menos importantes por el tamaño menor de sus frutos (que en general varían entre 65 y 75 g) aunque no por sus cualidades, son: ‘Monty’, ‘Abbott’, ‘Bruno’, ‘Kramer’, ‘Blake’, etc.

Por otra parte, ‘Tomuri’ y ‘Matua’ son cultivares masculinos (con flores estaminíferas capaces de producir polen viable), utilizados para la polinización de las variedades femeninas.

A. chinensis - los frutos de esta especie, a diferencia de los frutos de *A. deliciosa* tienen forma característica con una protuberancia del extremo estilar, llamada "pico", epicarpo liso, prácticamente sin vellosidades, y pulpa de color amarillo brillante (Nishiyama, 2007). ‘Hort16A’ es el cultivo más conocido de esta especie, desarrollado por HortResearch a partir del germoplasma introducido desde China en Nueva Zelanda.

El estudio del número de cromosomas sugirió que las especies de *Actinidia* forman series poliploides basadas sobre un número haploide de cromosomas $x = 29$, donde *A. deliciosa* es hexaploide ($6n = 174$) y *A. chinensis* es diploide ($2n = 58$) (Atkinson et al., 1997).

Sus cultivos son muy recientes: *A. deliciosa* ha sido cultivada comercialmente en los últimos 70 años, en tanto que *A. chinensis* lo ha sido por sólo 20 años. Hoy, en la industria internacional, el término “kiwi” se utiliza para hacer alusión al fruto de estas dos especies.

El kiwi es una baya altamente nutritiva. Es una importante fuente de sustancias naturales antioxidantes, en particular de vitamina C (Nishiyama et al., 2004), cuyo contenido se encuentra dentro del rango comprendido entre 25 y 155 mg cada 100 g de peso fresco del fruto. Además, contiene beta-caroteno, luteína, antocianinas y ácido elágico (Nishiyama, 2007). Por cada 100 g de peso fresco, el kiwi incluye cantidades significativas de Ca (40 mg), K (300 mg), Fe (0,4 mg) y Mg (25 mg) (Ferguson, 2008), fibra dietaria y compuestos antimutagénicos. El contenido de la pulpa del kiwi en compuestos antioxidantes es relativamente elevado, resultando el 4° dentro una serie de 24 frutos de distintas especies (Guo et al., 2003). La mayor parte de la actividad antioxidante se debe a la misma vitamina C. La cantidad de estos componentes bioactivos depende de diversos factores (Kader, 1988), entre los cuales se encuentra el estadio de maduración, un factor importante que influye sobre la calidad de la composición de frutas y hortalizas. De hecho, durante la maduración del fruto suceden varias modificaciones bioquímicas, fisiológicas y estructurales que determinan las cualidades finales del fruto. También las condiciones del almacenamiento pueden influir sobre los índices de calidad y el contenido nutricional del fruto fresco (Lee y Kader,

2000; Ayala-Zavala et al., 2004). Tavarini et al. (2008) encontraron que el tiempo de cosecha y las condiciones del almacenamiento del kiwi influyen fuertemente sobre las características cualitativas y nutritivas.

Al principio del siglo XIX, las actinidias, simplemente crecían de manera silvestre en China, y se considera que estas plantas son originarias del valle del río Yang-Tse. En 1904, las semillas de kiwi fueron importadas a Nueva Zelanda por primera vez (Ferguson, 2004). Posteriormente, el kiwi fue domesticado en Nueva Zelanda y lanzado al mercado mundial en la década de 1960. La industria del kiwi ha progresado vertiginosamente desde entonces y en la actualidad son comunes y fáciles de obtener durante todo el año. Comercialmente, el kiwi se produce en varios países, especialmente en Italia, China, Nueva Zelanda, Chile, Francia, Japón y Estados Unidos. La actinidia es una planta de clima templado, por lo cual la Argentina podría producir sus frutos hasta niveles que permitieran el autoabastecimiento e inclusive la exportación. En contraste con otros países del Hemisferio Sur como Chile y Nueva Zelanda, la Argentina sigue sin desarrollar suficientes investigaciones básicas o tecnológicas sobre el kiwi, y este factor conspira seriamente para la extensión del período de abastecimiento al mercado interno. La Argentina importa de Chile la mayor parte del producto consumido, por insuficiente desarrollo de la producción local y por las grandes pérdidas en postcosecha que se suceden año tras año.

Además de sus cualidades nutritivas, el kiwi posee larga vida de almacenamiento cuando se efectúan las prácticas de postcosecha correctas. El kiwi puede ser conservado entre 3 y 6 meses a temperatura de 0 °C y con humedad relativa entre 90 y 95% (Thompson et al., 2000), pero en la Argentina existe un déficit de instalaciones frigoríficas y se desconsidera el uso de tecnologías complementarias, como las atmósferas controladas. Por esa razón, los pequeños productores suelen dejar el fruto en planta por un tiempo mayor al recomendado, cosechándolo sólo y recién al momento de su comercialización.

1.3. Crecimiento y desarrollo de los frutos: el caso del kiwi

Los frutos pueden adoptar diferentes patrones de crecimiento, que suelen ajustarse a dos modelos principales: el modelo sigmoideo y el modelo sigmoideo doble.

El primer patrón de crecimiento sigue un modelo representado por una curva sigmoidea suave, ejemplificada con el crecimiento de manzanas, peras y frutos cítricos. Este modelo presenta tres fases bien definidas: la Fase I o período de crecimiento exponencial (multiplicación celular), la Fase II o período de crecimiento lineal (agrandamiento o expansión celular) y la Fase III, que incluye la etapa final del crecimiento y el período de maduración (Sozzi, 2007a).

El segundo patrón de crecimiento en frutos se asocia a un modelo de curva sigmoidea doble, visualizada como dos curvas sigmoideas sucesivas, y corresponde a frutos como las uvas, los arándanos, los higos, los duraznos, las ciruelas, las cerezas y los kiwis. Los frutos con este patrón de crecimiento presentan cuatro etapas. En la Fase I o período de rápido crecimiento, el ovario y su contenido crecen exponencialmente. En la Fase II, o “plateau”, se produce el crecimiento del embrión y del endosperma, y la esclerificación del endocarpo en las frutas de carozo, pero en frutos como las bayas (uvas, kiwis) simplemente se verifica una marcada disminución de la tasa de crecimiento. Durante la Fase III tiene lugar un crecimiento rápido del mesocarpo que promueve un incremento acelerado en el tamaño y el peso del fruto, aunque existen excepciones como el kiwi, en el cual el mayor incremento de tamaño se produce en la Fase I. La Fase IV es aquélla en la que se produce la maduración del fruto (Sozzi, 2007a).

En general, el kiwi manifiesta un patrón de crecimiento que se puede asociar a un modelo de curva sigmoidea doble, aunque Pratt y Reid (1974) señalan el posible ajuste a un modelo de crecimiento que se asemeja a una curva sigmoidea triple. El fruto atraviesa un prolongado período de crecimiento que dura aproximadamente 160-180 d desde la antesis hasta que la baya alcanza su máximo tamaño, o hasta la cosecha realizada con los indicadores mínimos requeridos (Gallego y Zarra, 1997; Sozzi, 2007a). Después de la polinización, se verifica una primera fase de rápido crecimiento y ganancia de peso por división celular, seguida de agrandamiento celular, que dura aproximadamente 8-10 semanas, durante la cual el fruto alcanza más de la mitad del volumen final. Luego sigue la segunda fase de alrededor de 3 semanas de duración – aunque puede extenderse ante situaciones particulares, como estrés hídrico –, con crecimiento más lento dado por la limitada expansión celular. Posteriormente se observa otra fase de crecimiento rápido que dura 7 o más semanas, variando según los cultivares, la zona de producción y las condiciones meteorológicas de cada campaña

agrícola. Luego de alcanzada la madurez fisiológica, el fruto puede continuar su crecimiento con una ligera expansión celular, siempre y cuando se mantenga unido a la planta. El fruto resulta sumamente firme durante las primeras fases de su desarrollo, pero la firmeza comienza a disminuir lentamente durante la última fase, luego de alcanzada la madurez fisiológica, para luego producirse un ablandamiento acelerado y otro más lento a posteriori.

1.4. La maduración de los frutos climatéricos: el caso del kiwi

La maduración de los frutos es la etapa del desarrollo en que los frutos adquieren aquellos caracteres organolépticos específicos que los vuelven apropiados para su consumo (Sozzi, 2007b). Durante la maduración, los frutos se encuentran sometidos a abundantes modificaciones fisiológicas y bioquímicas que incluyen la conversión del almidón en azúcares, biosíntesis y acumulación de nuevos pigmentos, biosíntesis de compuestos volátiles aromáticos, y cambios en la ultraestructura de la pared celular y de su metabolismo, lo que resulta en la pérdida de firmeza de la pulpa de los frutos.

En el transcurso de la maduración se distinguen dos clases diferentes de madurez: la madurez fisiológica y la madurez organoléptica (o de consumo). La madurez fisiológica es el estado de desarrollo del fruto que le permite iniciar un programa genético conducente a su madurez organoléptica y lograr así los atributos de calidad aceptables para su consumo. Madurez organoléptica es aquel estado de desarrollo en el cual el fruto tiene el color, la textura, el aroma y el sabor que lo vuelven deseable para su consumo en la percepción promedio de sus consumidores. En otras palabras, el fruto organolépticamente maduro es aquél que se encuentra “listo para consumir”. Los frutos sólo alcanzan la madurez fisiológica si permanecen unidos a la planta, por lo tanto no se deben cosechar antes de alcanzar ese estado (Sozzi, 2007b).

Los frutos con diferentes mecanismos de maduración se pueden clasificar en dos grupos: climatéricos y no climatéricos. Las categorías “climatérico” y “no climatérico” se desarrollaron sobre la base de la presencia o la ausencia de un incremento de la tasa respiratoria durante la maduración. En general, la producción autocatalítica de etileno (es decir, el aumento en la producción de etileno promovido por el mismo etileno durante la maduración) está asociada con el aumento en la tasa respiratoria de los frutos climatéricos (Alexander y Grierson, 2002; Sozzi, 2007b). Típicamente, la presencia o

ausencia de un climaterio se sustenta en la evidencia de una producción de etileno autocatalítica, más que en la respiración. Los frutos climatéricos son aquéllos en los que la maduración está acompañada por el pico de respiración y el concomitante aumento en la biosíntesis de etileno, y presentan el siguiente comportamiento: la aplicación de etileno adelanta el tiempo del climaterio respiratorio; la magnitud de la tasa respiratoria es independiente de la concentración del etileno aplicado; la producción autocatalítica de etileno continúa luego de retirado el tratamiento con el etileno; y además, hay una respuesta clara a la aplicación del etileno en la mayor parte de los índices de madurez propios de cada fruto (firmeza, color, degradación de almidón, etc.).

En cambio, en los frutos no climatéricos no se detectan cambios drásticos en la respiración durante la maduración, y la producción de etileno permanece a niveles basales, es decir, por lo general bajos (Alexander y Grierson, 2002; Sozzi, 2007b).

Existen otras diferencias marcadas entre los frutos climatéricos y no climatéricos. Los frutos climatéricos, una vez recolectados, pueden continuar su maduración hasta alcanzar las propiedades organolépticas óptimas para su consumo, merced a la hidrólisis del almidón sintetizado y almacenado durante su crecimiento. En cambio, los frutos no climatéricos no suelen almacenar cantidades significativas de almidón, sino azúcares solubles de bajo peso molecular a partir de los fotoasimilados provenientes de la planta madre por lo cual, una vez cosechados (es decir, separados de la planta), no tienen capacidad de mejorar sus características organolépticas (Sozzi, 2007b).

A pesar de que algunos investigadores consideraron al tomate como “modelo” de un fruto climatérico (Alexander y Grierson, 2002), se verifican diferencias muy marcadas entre diferentes especies, e incluso entre variedades, tanto en la forma en que se suceden los cambios conducentes a la maduración como en su incidencia posterior. Por ello, resulta cada vez más inviable el concepto de “fruto modelo”, como así también la extrapolación de procesos bioquímico-fisiológicos de una especie a otra (Sozzi, 2004; Brummell, 2006).

A 20 °C, el kiwi manifiesta el comportamiento de un fruto climatérico, con un aumento en la producción del etileno acompañado por un incremento de la tasa respiratoria. No obstante, la maduración del kiwi difiere marcadamente de la de cualquier otro fruto climatérico ya que, en condiciones de conservación entre 0 y 10 °C,

manifiesta un comportamiento no climatérico (Antunes et al., 2000), ablandándose en gran medida en ausencia de aumentos significativos en la biosíntesis autocatalítica de etileno (Arpaia et al., 1994; Kim et al., 1999; Ritenour et al., 1999; Boquete et al., 2004). En la mayoría de los frutos climatéricos (tomate, manzana), el pico de producción de etileno suele subdividir la etapa final de desarrollo del fruto en un período llamado “pre-climaterio”, en el que se pone de manifiesto cierto crecimiento celular sin producirse aún pérdidas significativas de firmeza, y otros períodos posteriores llamados “climaterio” (pico de etileno) y “post-climaterio” (período posterior al pico de etileno) caracterizados por un ablandamiento sustancial del fruto. En cambio, el kiwi no alcanza el climaterio hasta muy avanzada la etapa de ablandamiento (Arpaia et al., 1994; Xu et al., 1998; Kim et al., 1999; Ritenour et al., 1999; Boquete et al., 2004). Sin embargo, el kiwi que alcanzó su madurez fisiológica pero que todavía está inmaduro para su consumo es muy sensible a la presencia (involuntaria o controlada) de etileno o de compuestos análogos del etileno (como el propileno o el acetileno) en el ambiente. Esta separación fisiológica entre la “etapa de sensibilidad al etileno” y la “etapa de biosíntesis del etileno” hace del kiwi un sistema único que permite analizar el rol del etileno y sus alcances en la maduración (Whittaker et al., 1997).

1.5. El etileno y la maduración de los frutos

El etileno es un regulador vegetal gaseoso, que produce efectos muy variados y drásticos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en general, y sobre ciertos procesos en particular, tales como la germinación de las semillas, la senescencia de órganos y las respuestas a factores abióticos o bióticos del estrés, tales como la inundación, temperaturas extremas, daño físico o mecánico (por ejemplo, heridas, compresión, impacto, vibración), daño químico (por ejemplo, aplicación de ciertos compuestos fitoterápicos y/o de naturaleza hormonal) o daño biológico (por ejemplo, ataques de insectos o de agentes patógenos) (Abeles et al., 1992). De entre todos los efectos del etileno, el mejor conocido y el más estudiado es la promoción y la coordinación de la maduración de los frutos climatéricos (Chang y Stadler, 2001).

La ruta de síntesis del etileno fue elucidada por Adams y Yang (1979) e involucra los siguientes tres pasos finales: metionina → S-adenosil-L-metionina (SAM) → ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) → etileno. Los últimos dos pasos

están catalizados por las enzimas ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACS) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACO), respectivamente, las cuales son enzimas claves y regulatorias de la síntesis del etileno. ACS y ACO están codificadas por familias multigénicas en la inmensa mayoría de las especies estudiadas, y su expresión está regulada por factores del desarrollo y por el ambiente (Kende, 1993). Sus genes codificantes se investigaron intensamente en especies muy diversas, incluyendo el kiwi, *Actinidia deliciosa* (Ikoma et al., 1998, 1999; Xu et al., 1998, 2000).

1.5.1. Los receptores del etileno

La percepción de la señal del etileno y su transducción fueron estudiadas extensamente a nivel bioquímico en general y génico en particular. Se estableció un modelo lineal de transducción de la señal, en el cual el etileno es inicialmente percibido por una familia de receptores ubicados en la membrana del retículo endoplasmático. Esa familia puede ser dividida en dos subfamilias a partir del análisis filogenético, de secuencia y de ciertas características estructurales compartidas: por ejemplo, en *Arabidopsis*, la subfamilia-1 está constituida por ETR1 y ERS1, y la subfamilia-2 por ETR2, ERS2 y EIN4 (Hall et al., 2007 y referencias allí incluidas). En *Arabidopsis*, el modelo actual sugiere la existencia de contribuciones diversas a la señalización por parte de los receptores, siendo los receptores de la subfamilia-1 los que juegan un papel más significativo en la transmisión de la señal que los de la subfamilia-2. La unión reversible del etileno a los receptores induce cambios de conformación que regulan la señalización y el flujo de la señal a través de elementos codificados por otras familias génicas, incluyendo CTR1, EIN2, EIN3/EILs y ERFs (Chang y Stadler, 2001; Chen et al., 2005; Hall et al., 2007). Los receptores del etileno tienen alta similitud con los sistemas de señal bacterianos de dos componentes. Diversos estudios sugieren la existencia de variados mecanismos posibles para la salida de la señal de los receptores, que pueden involucrar tanto cambios en la actividad enzimática como cambios de conformación (revisado por Hall et al., 2007). Otros estudios indican la importancia de las interacciones, tanto físicas como génicas, entre los receptores y el componente inmediatamente posterior en el camino de señalización. Se trata de CTR1, una proteína que guarda similitud con las quinasas serina/treonina de la familia Raf y que actúa, no sólo como regulador negativo, sino también como componente integral del complejo de señalización receptor del etileno.

Por el contrario, otros componentes de la ruta de señalización fueron identificados como reguladores positivos, y la pérdida de sus funciones o la sobreexpresión de los mismos pueden provocar la insensibilidad o la respuesta constitutiva al etileno, respectivamente. Los receptores de la familia EIN3/EIL son considerados como reguladores positivos, que estimulan otros factores de transcripción, tales como ERF1 (Solano et al., 1998). Chen et al. (2005) presentaron un modelo de transducción de la señal del etileno donde están incorporadas las relaciones génicas entre los principales elementos intervinientes y los datos bioquímicos de la ruta. El papel que los mismos desempeñan en la señalización está justificado por múltiples líneas de la investigación.

Los receptores de etileno son codificados por familias multigénicas, y sus genes y patrones de expresión fueron identificados y estudiados en diversas especies vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana* (Chang et al., 1993; Sakai et al., 1998), arroz (Yau et al., 2004), maíz (Gallie y Young, 2004), tomate (Wilkinson et al., 1995; Lashbrook et al., 1998), manzanas (Tatsuki et al., 2007), peras (El-Sharkawy et al., 2003), durazno (Rasori et al., 2002), kaki (Pang et al., 2007) y melón (Sato-Nara et al., 1999).

Recientemente, se identificaron en kiwi diferentes componentes asociados a la ruta de transducción de señales del etileno, entre los cuales se cuentan cinco genes codificantes de receptores del etileno, dos genes codificantes para proteínas similares de CTR1, factores de transcripción codificantes de cuatro proteínas similares de EIN3 (*AdEILs*), y 14 factores de respuesta al etileno (*ERFs*) (Yin et al., 2008, 2009, 2010). Todos ellos se expresaron de forma diferente en distintos tejidos de la planta de actinidia, y ninguno fue específico de los frutos. Durante el desarrollo del fruto se detectó una disminución de los niveles de transcritos de *AdERS1a*, *AdETR3* y de dos genes del tipo CTR, mientras que *AdERS1b* y *AdETR2* alcanzaron su punto de expresión máxima 97 d después de plena floración. En el kiwi maduro, se detectó una respuesta diversa de los receptores al etileno endógeno y exógeno. *AdERS1a*, *AdETR2* y *AdETR3* aumentaron su expresión durante el climaterio y sus transcritos fueron inducidos por el etileno exógeno. Al contrario, *AdERS1b* no demostró una respuesta al etileno. El gen *AdETR1* fue regulado negativamente por el etileno endógeno y exógeno durante la maduración de los frutos. Los dos genes codificantes para CTR1 mostraron diferentes patrones de expresión.

La complejidad de la ruta de transducción de señales y diversidad de receptores del etileno a ella asociados explica en buena medida la dificultad que existe para determinar la forma exacta de acción del 1-metilciclopropeno (1-MCP), inhibidor de la acción del etileno, como se detalla más adelante. Por otra parte, la variedad y multiplicidad de receptores que existe en diferentes especies justifica ampliamente la diferente respuesta interespecífica al 1-MCP.

1.5.2. El etileno y el ablandamiento de los frutos: el caso del kiwi

El etileno es un disparador dominante para la maduración de los frutos climatéricos. Una hipótesis ya clásica en el área de la maduración de los frutos propuso la existencia de dos sistemas de regulación de la producción del etileno, ambos operativos en los frutos climatéricos (McMurchie et al., 1972). El “sistema I” es un sistema de producción del etileno presente en los tejidos vegetales en general, incluyendo los frutos en estado preclimatérico (inmaduro) y los frutos no climatéricos. El etileno producido en este sistema sólo alcanza niveles basales. En cambio, el “sistema II” opera durante la maduración de los frutos climatéricos o en tejidos vegetales sometidos a condiciones de estrés, cuando la producción del etileno es autocatalítica. El etileno exógeno o la aplicación de compuestos análogos del etileno (como propileno o acetileno) producen retroinhibición de la producción del etileno en tejidos regidos únicamente por el sistema I, y la producción autocatalítica de etileno en tejidos en los que el sistema II se encuentra activo (revisado en Sozzi, 2007b). Como ya se mencionó, resulta un hecho aceptado que la pérdida de firmeza de la mayoría de los frutos climatéricos está principalmente asociada con la acción del etileno, aunque coexisten otros factores bióticos y abióticos que intervienen, actuando de forma integrada (por ejemplo, Fonseca et al., 2005; Saladié et al., 2007). Aún cuando algunos grupos de investigación han señalado la existencia de genes con regulación independiente del etileno (Alexander y Grierson, 2002; Lelievre et al., 1997) y factores de transcripción de tipo “MADS box” de características similares en frutos climatéricos y no-climatéricos (Vrebalov et al., 2002) que podrían sugerir la existencia de mecanismos regulatorios comunes a la maduración en ambos tipos de frutos (Giovannoni, 2004), el etileno continúa considerándose por lejos la hormona central y principal en la regulación de la maduración de los frutos climatéricos. Más aún, en ciertos frutos como la pera europea, se considera a la percepción del etileno como

requisito –tanto para el inicio como para el avance– del proceso de ablandamiento (Hiwasa et al., 2003a).

En el kiwi, la maduración no está asociada con el cambio de color del epicarpo del fruto. Por eso, la mayoría de las descripciones de la maduración tienen como principales índices de madurez a la firmeza del fruto y a su contenido de sólidos solubles. En la práctica comercial, el kiwi debe cosecharse con un contenido de sólidos solubles mayor a 6,5 %, recomendándose valores de firmeza (medida con una sonda de 7,9 mm de diámetro) no menores a 62 N, aunque usualmente el fruto presenta valores cercanos a 80 N a la cosecha. El ablandamiento del kiwi ocurre en una serie de estadios consecutivos (Paterson et al., 1991; MacRae y Redgwell, 1992). El kiwi mantiene su firmeza inicial próxima a 78 N durante 3-5 d (Estadio 1). En el Estadio 2, el ablandamiento es muy notable: en él, la firmeza del fruto decrece hasta alcanzar aproximadamente el 20% de su valor inicial al momento de la cosecha. Esta etapa puede acelerarse mediante una exposición de los frutos al etileno, o demorarse mediante el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas, combinado o no con atmósferas controladas (Mir y Beaudry, 2002) y/o con 1-MCP (Boquete et al., 2004; Koukounaras y Sfakiotakis, 2007; Sozzi y Beaudry, 2007). En relación con el uso de atmósferas controladas, cabe mencionar que la utilización de niveles de CO₂ superiores a 5 % puede ocasionar problemas de pudrición en kiwi (Tonini et al., 1989; Kader, 1997), razón por la cual resulta fundamental no superar esos niveles para asegurar una calidad apropiada (Harman y McDonald, 1989). Además, la combinación de CO₂ y presencia de etileno también puede generar inclusiones indeseables en la columela (Arpaia et al., 1985). El climaterio respiratorio se asocia con la última etapa (Estadio 3) del ablandamiento durante la cual el kiwi pierde su firmeza lentamente, pasando por niveles de firmeza apropiados para el consumo del fruto hasta la sobremadurez. La diferenciación del ablandamiento del kiwi en estadios permite distinguir los procesos que ocurren durante la etapa de rápida pérdida de firmeza (Estadio 2) de aquellos otros que se producen durante la etapa de fruto comestible (Estadio 3).

Un tratamiento con etileno efectuado a un lote de kiwis reduce el tiempo total del ablandamiento desde aproximadamente 2 a 4 semanas a 1 semana, aunque esto varía con el origen de cada lote (Schröder y Atkinson, 2006).

La exposición del kiwi a bajas temperaturas de entre 0 y 10 °C durante 12 o más días provoca un avance en el pico de biosíntesis de etileno y en la maduración, cuando

se lo compara con los frutos mantenidos continuamente a 20 °C. El avance en la biosíntesis de etileno se debe al incremento de la actividad de ACS y ACO inmediatamente después del atemperamiento de los frutos (Antunes y Sfakiotakis, 2002). Además, se conoce que existe una respuesta diferencial de distintos genes por exposición de los kiwis a bajas temperaturas (Yin et al., 2009).

1.5.3. Los inhibidores de la acción del etileno: el 1-MCP

El etileno puede afectar marcadamente la calidad de los productos frutihortícolas después de la cosecha. Los efectos pueden ser beneficiosos o perjudiciales, dependiendo del producto, de su grado de maduración, y del uso deseado para el mismo (Saltveit, 1999). La producción de etileno endógeno es parte esencial de la maduración de los frutos climatéricos y probablemente actúa como reóstato para los procesos dependientes del mismo (Theologis, 1992). La aplicación de etileno se usa rutinariamente para iniciar una maduración uniforme de algunos frutos como, por ejemplo, la banana. Es común, sin embargo, que las estrategias comerciales para los productos frutihortícolas se basen en evitar la exposición al etileno, minimizando la producción o la acción del mismo durante la maduración, la cosecha, el almacenamiento, el empaque, el transporte y el expendio, utilizando técnicas variadas que incluyen la refrigeración, el uso de atmósferas controladas o modificadas, el uso de secuestradores o agentes oxidantes del etileno (por ejemplo, KMnO_4 , ozono), y la utilización de agentes bloqueantes de la síntesis y/o de la acción del etileno (Watkins, 2006).

Edward Sisler y su equipo desarrollaron tres generaciones de antagonistas de la acción del etileno: 2,5-norbornadieno y sus análogos, diazociclopentadieno y ciclopropenos, capaces todos ellos de afectar diferentes procesos del desarrollo, incluyendo la maduración y la senescencia de los frutos (Sisler, 2006). Sin embargo, el uso del 2,5-norbornadieno requiere de una exposición continua de los tejidos vegetales a altas concentraciones del compuesto químico para que resulte efectivo y además puede producir aromas extraños en los frutos; por su parte, el diazociclopentadieno es un compuesto explosivo cuando se usa en altas concentraciones (Sisler y Blankenship, 1993). De esta manera, estos dos compuestos presentan varias desventajas para su uso comercial. Entre los ciclopropenos, el 1-MCP es el más prometedor como inhibidor de la acción del etileno, debido a que posee mayor estabilidad que el ciclopropeno, y

resulta 1.000 veces más activo que el 3,3-dimetilciclopropeno (Sisler y Serek, 1997). El uso de los ciclopropenos para inhibir la acción del etileno fue patentado por Sisler y Blankenship (1996).

El 1-MCP es un antagonista gaseoso muy efectivo que inactiva los receptores del etileno en diferentes frutos y otros tejidos vegetales durante varios días, mediante una única aplicación en dosis bajas de esa olefina cíclica. La maduración posterior de los frutos tratados con 1-MCP se produce presuntamente por la capacidad de los tejidos vivos para sintetizar nuevos receptores luego de la aplicación del producto. Por no haber sido expuestos a la presencia de 1-MCP, esos nuevos receptores no se hallan bloqueados. Así, el etileno puede eventualmente unirse a ellos de forma reversible y desarrollar sus funciones regulatorias, desencadenando la cascada de señales conducente a la maduración (Sozzi, 2007b).

El 1-MCP es inodoro, estable a temperatura ambiente, activo a muy bajas concentraciones, y no tiene toxicidad, con bajos niveles de residuos mensurables ($<0,1$ ppm) en frutos (EPA, 2002). El 1-MCP fue aprobado primeramente por la Agencia de Protección del Ambiente (EPA) en el año 1999 para su uso en plantas ornamentales y se comercializó como EthylBloc® por Floralife, Inc. (Walterboro, SC). AgroFresh, Inc., filial de Rohm y Haas (Springhous, PA), desarrolló el 1-MCP bajo el nombre comercial SmartFresh™ para el uso en productos hortícolas comestibles (Watkins, 2006; Sozzi y Beaudry, 2007). En el año 2005, la 'Food and Drug Administration' homologó el uso del 1-MCP en diversos alimentos de tipo frutihortícola. En el año 2007, el 1-MCP se encontraba aprobado para su uso en muchos países, entre ellos Alemania, Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, China, Corea del Sur, Costa Rica, Estados Unidos de América, Francia, Guatemala, Honduras, Irlanda del Norte, Israel, Italia, Kenia, México, Nicaragua, los Países Bajos, Nueva Zelanda, Reino Unido, Sudáfrica, Suiza y Turquía (Sozzi y Beaudry, 2007), mientras que los procesos de registro del producto alcanzaban diferentes grados de avance en otros países.

El 1-MCP se registró para su uso en diversos productos, que varían según cada país, y que abarcan las manzanas, los damascos, las paltas, los kiwis, los mangos, los melones, las nectarinas, las papayas, los duraznos, las peras, los pimientos, los kakis, los ananás, los plátanos, las ciruelas, las calabazas, los tomates y los bulbos de los tulipanes (Sozzi y Beaudry, 2007). Existen registros pendientes para el uso del 1-MCP en otras

frutas y hortalizas y para otros países, los cuales se estiman que serán emitidos en el corto plazo.

El progreso comercial de la aplicación tecnológica del 1-MCP resultó en la formulación del 1-MCP como un polvo estable, en el que el principio activo se entrapa en una γ -ciclodextrina, de tal forma que el 1-MCP resulta rápidamente liberado como un gas después que el polvo se disuelve en el agua. Así, el 1-MCP constituye una herramienta que permite nuevas estrategias para inhibir la acción del etileno y, por lo tanto, la maduración y la senescencia de frutos, especialmente climatéricos (Blankenship y Dole, 2003; Watkins, 2006; Sozzi y Beaudry, 2007; Watkins, 2008).

El efecto del 1-MCP se estudió en una amplia variedad de frutos, tanto a nivel fisiológico como génico. Las manzanas constituyen un ejemplo importante dentro de los productos frutihortícolas para demostrar las oportunidades y las limitaciones del 1-MCP. Las manzanas fueron las primeras en recibir la certificación para el uso del 1-MCP, el cual fue incorporado rápidamente en la industria mundial por los excelentes resultados que reporta (revisado por Watkins, 2006; Sozzi y Beaudry, 2007; Watkins, 2008). En las manzanas, las altas concentraciones de etileno endógeno asociado con el climaterio en la maduración son inhibidas después de tratamientos con el 1-MCP, pero el grado de inhibición depende fuertemente del cultivar, del manejo del producto, del tiempo de almacenamiento transcurrido antes del tratamiento, de la dosis y de la combinación con otras técnicas de conservación (Fan y Mattheis, 1999; Fan et al., 1999; Watkins et al., 2000; Dauny y Joyce, 2002; Toivonen y Lu, 2005).

1.5.4. El 1-MCP en kiwi

La aplicación del 1-MCP al kiwi inmediatamente después de su cosecha reduce la producción de etileno y el ablandamiento de los frutos almacenados posteriormente a 20 °C (Kim et al., 2001; Koukounaras y Sfakiotakis, 2007). En el kiwi, el 1-MCP impide la respuesta de todos los componentes del sistema de receptores del etileno, pero sólo se observó una disminución en el nivel de transcritos de *AdETR2* y *AdCTR1* por aplicación de 1-MCP, ocurriendo además una disminución de la expresión de *AdETR3* luego de 21-25 d (Yin et al., 2008). Sin embargo, no existe información sobre la expresión de los genes codificantes de las enzimas ACS y ACO en kiwis tratados con 1-

MCP, lo que resulta de importancia central para la comprensión del proceso de maduración y ablandamiento. De hecho, los genes que codifican para las enzimas ACS y ACO en distintos frutos climatéricos responden de formas diferentes ante la aplicación de 1-MCP. En manzanas, la aplicación de 1-MCP reduce drásticamente la expresión de los genes codificantes de las enzimas ACO y ACS, mientras que no se observaron efectos de interés sobre dichos genes en el durazno (Dal Cin et al., 2006).

Los efectos del 1-MCP en la maduración del kiwi parecen ser variables (Watkins, 2008). En efecto, el 1-MCP demora el ablandamiento cuando el fruto es tratado al momento de cosecha (Kim et al., 2001; Menniti et al., 2005; Koukounaras y Sfakiotakis, 2007), pero los efectos se pierden durante el almacenamiento en cámara fría, incluso cuando las concentraciones de 1-MCP aplicadas son elevadas (Kim et al., 2001; Antunes et al., 2010). Por otra parte, Colelli y Amodio (2003) no detectaron efectos del 1-MCP en frutos tratados después del almacenamiento en frío. La sumatoria de estos resultados condujo a la suposición de que los beneficios de la aplicación del 1-MCP en kiwi serían limitados (Watkins, 2008). En oposición a lo anterior, Boquete et al. (2004) mostraron que los kiwis tratados con 1-MCP después de 30 d de conservación en frío e inmediatamente antes de retornar los frutos a temperatura ambiente, manifiestan niveles muy bajos de producción de etileno y valores de firmeza más elevados que los frutos no tratados al ser posteriormente almacenados a 20 °C. Sin embargo, se desconoce el tiempo que el kiwi podría estar sometido al frío y aún evidenciar una respuesta a la aplicación de 1-MCP. Por otra parte, no se encontró un protocolo de aplicación que pudiera integrar los resultados aparentemente contrapuestos obtenidos por los distintos equipos de investigación.

En esta Tesis se estableció provisionalmente –como base de una investigación que pudiera confirmar o negar la validez de las aseveraciones de Watkins (2008)– la hipótesis de trabajo de que, contrariamente a lo que sucede en la mayoría de frutos climatéricos (por ejemplo, en manzanas, en peras, en caquis y en ciruelas con climaterio no suprimido) que sólo expresan respuestas impactantes al 1-MCP en un período muy limitado de su proceso de maduración, el kiwi es capaz de responder al 1-MCP durante casi todas las etapas de ablandamiento del fruto, siempre y cuando el regulador sea aplicado inmediatamente antes de su salida de cámara fría. Esto tendría: 1) un impacto categórico a nivel básico, pues permitiría inhibir la acción del etileno y determinar cuáles procesos son dependientes del etileno en cualquier etapa del ablandamiento del

fruto; y 2) consecuencias decisivas a nivel industrial, pues permitiría prolongar la vida del fruto en postcosecha, no en estados de inmadurez de consumo, sino cuando éste ya se encuentra en condiciones de ser consumido.

1.6. Estructura, composición y metabolismo de la pared celular

Durante el proceso de maduración de los frutos, una serie de eventos programados genéticamente cambia las características de un fruto inmaduro, firme, y ácido a las de un fruto con apariencia usualmente más atractiva, dulce y con una textura suave. La síntesis de compuestos volátiles (responsables de los aromas), y de ácidos orgánicos y de azúcares (responsables principales del sabor), se combina con una serie de cambios en las propiedades texturales de los frutos. La firmeza constituye una medición instrumental ampliamente utilizada como representante de la textura. Si bien dos frutos de firmeza similar pueden diferir considerablemente en su aceptación por parte del consumidor debido a disparidades en términos de su textura más o menos fundente (jugosidad), los científicos y técnicos usan la medición de la firmeza como un buen indicador del grado de madurez y de calidad de los kiwis, junto con otros índices, como se comentó anteriormente.

La firmeza de los frutos está condicionada por varios factores, siendo uno de los principales la rigidez mecánica determinada por las paredes celulares (Harker et al., 1997). El ablandamiento de los frutos es un proceso multifacético resultante de una plétora de cambios a nivel morfológico y celular, entre los que se destacan el desensamblaje de la pared celular y la reducción de la presión de turgencia. Durante el crecimiento del fruto, sus células soportan presiones importantes y requieren simultáneamente del mantenimiento de la resistencia de la pared celular, y de su relajación con integración continua de nuevos componentes estructurales a los polímeros de la pared celular (Cosgrove, 1997a, 2003). Durante la maduración, el desensamblaje de la arquitectura de la pared celular se asocia con la degradación de esos polisacáridos y la modificación de las uniones entre polímeros. Además, la presión de turgencia disminuye debido a la acumulación de solutos en el espacio de la pared celular, contribuyendo a los cambios texturales durante la maduración (Brummell, 2006). En el caso del kiwi, un almacenamiento a 20 °C durante 3 semanas produce no sólo una disminución de la firmeza sino también del diámetro del fruto, y una

acumulación de agua en el mesocarpo, sugiriendo que existe una migración del agua hacia los tejidos más externos del fruto y que las pérdidas por evapotranspiración son más lentas que el proceso de migración del agua (Taglienti et al., 2009).

La pared celular es una estructura compleja, responsable de la forma y rigidez de las células en muchos tejidos vegetales. Además, participa en la adhesión de las células entre sí, en la señalización entre las células, en los mecanismos de defensa y en numerosos procesos del crecimiento y de la diferenciación (Cosgrove, 1997b). La pared celular está altamente hidratada (~65% de agua) y el componente acuoso contiene diversos solutos disueltos, que abarcan iones y proteínas solubles (incluyendo enzimas). En plantas, la pared celular primaria es considerada como una red de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de glicanos de matriz y pectinas (Figura 1.2; Carpita y Gibeau, 1993; Cosgrove, 1997b; Brummell, 2006). En plantas dicotiledóneas, la composición general de la pared celular primaria incluye aproximadamente 30% de celulosa, 30% de glicanos de matriz (hemicelulosas), 35% de pectinas y 5% de proteínas estructurales aunque, en paredes celulares de frutos, el contenido de pectinas puede ser sustancialmente mayor y el de proteínas menor (Cosgrove, 1997b).

1.6.1. Principales componentes de la pared celular

La composición y disposición de los polímeros que componen la pared celular varían entre especies, entre tejidos de la misma especie, entre células individuales e inclusive entre regiones de la misma pared que rodea un protoplasto (Carpita y McCann, 2000; O'Neill y York, 2003). Existen doce diferentes restos glicosilos constitutivos de todas las paredes primarias, aunque en diferentes cantidades. Estos restos glicosilos incluyen las hexosas (D-glucosa; D-manosa; D-galactosa y L-galactosa), las pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), las 6-deoxi hexosas (L-ramnosa y L-fucosa) y los ácidos hexurónicos (ácido D-galacturónico y ácido D-glucurónico). El ácido D-galacturónico está presente tanto como ácido cuanto como su derivado metil esterificado en el C6. Las paredes primarias contienen también un resto pentosilo ramificado (D-apiosa) y un resto glicosilo ácido ramificado (ácido acérico). En menor medida, se presentan algunos cetozúcares y restos mono-*O*-metil glicosilos. Todos los restos hidrocarbonados citados constituyen los hidratos de carbono presentes en las diferentes fracciones de la pared celular, que se comentan a continuación. Por otra parte,

una sección sustancial de este trabajo de Tesis se centra en la investigación de genes codificantes de enzimas capaces de liberar algunos de los restos glicosilos anteriormente citados: D-galactosa, L-arabinosa y, eventualmente, D-xilosa.

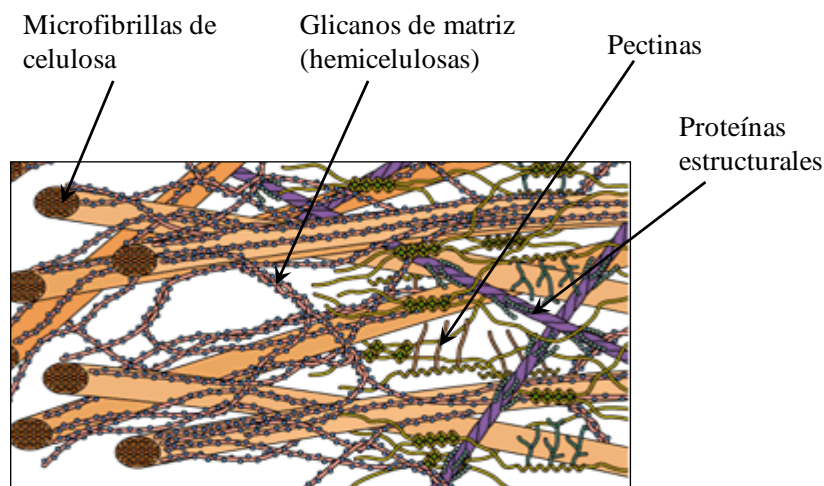


Figura 1.2 Modelo tridimensional de la estructura de la pared celular tipo I.

Se muestran las interacciones moleculares entre la celulosa, los glicanos de matriz, las pectinas y las proteínas estructurales de la pared celular (Carpita y McCann, 2000)

La estructura principal de la pared celular (Figura 1.2) se compone de:

➤ **Celulosa** - es un polímero lineal formado por entre 2000 y 2500 unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos β -(1,4). Las cadenas de glucanos se ensamblan entre sí por puentes de hidrogeno, conformando microfibrillas rígidas e inextensibles (Brummell, 2006) que pueden contener 36 cadenas de glucanos. Las regiones internas de las microfibrillas son cristalinas y excluyen el agua, mientras que las capas externas son más amorfas. La celulosa cristalina tiene una resistencia a la tracción muy elevada – equivalente a la del acero–, además es insoluble, químicamente estable, y relativamente “inmune” a los ataques enzimáticos (Cosgrove, 1997b).

➤ **Glicanos de Matriz** – anteriormente denominados en su conjunto con el nombre de “hemicelulosas”, son un grupo heterogéneo de glicanos no cristalinos, neutros o débilmente ácidos, compuestos predominantemente por azúcares neutros, sin contener ácido galacturónico. Están fuertemente ligados a través de uniones puentes de hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa (Varner y Lin, 1989).

En las paredes primarias de las plantas dicotiledóneas, el glicano de matriz más abundante y estudiado es el xiloglucano. Se trata de un polímero formado por un esqueleto de restos de D-glucosa en uniones β -(1,4), al igual que la celulosa, pero con el agregado a distancias regulares de cadenas cortas de α -D-xilosa, β -D-galactosa y α -L-fucosa en el carbono 6 de los restos de glucosa de la cadena principal del glucano (Fry, 1988). Los xiloglucanos son más largos que el espacio entre las microfibrillas de celulosa y tienen por eso la capacidad para conectar las microfibrillas.

Además de xiloglucanos, se encuentran presentes en una proporción mucho menor otros glicanos de matriz, tales como arabinoxilanos (polímeros con un esqueleto de restos xilosilos en uniones β -(1,4) con restos arabinosilos laterales), arabinoxiloglucanos (polímeros con una cadena principal constituida por restos glucosilos unidos por enlaces β -(1,4), sustituida por restos de xilosa en unión α -(1,6), seguidos de arabinosa en unión α -(1,2)) y glucuronoarabinoxilanos (conformados por un esqueleto principal de xilasas unidas por uniones β -(1,4), sustituidas por ácido glucurónico y arabinosa, ambos en uniones α -(1,2)) (Beldman et al., 1997; Saha, 2000; Sozzi et al., 2002).

➤ **Pectinas** - componen la fracción más soluble de los polisacáridos de la pared celular. Están constituidas por un grupo heterogéneo de polisacáridos, el cual normalmente contiene azúcares ácidos, tales como el ácido glucurónico y el ácido galacturónico, y azúcares neutros, tales como la ramnosa, la galactosa y la arabinosa (Cosgrove, 1997b).

Las pectinas más importantes de la pared celular vegetal son:

- Homogalacturonano – tiene una estructura primaria relativamente simple, ya que se trata de un polímero lineal, formado por restos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -(1,4). Los polímeros se conectan entre sí por uniones puentes de Ca^{2+} (Fry, 1988).

- Ramnogalacturonano I (RG I) – tiene repeticiones de subunidades de disacáridos (1,2)- α -L-ramnosil-(1,4)- α -D-galacturónico, con largas cadenas laterales de arabinanos y arabinogalactanos. Las cadenas de RG I pueden enrollarse alrededor de las microfibrillas, lo que posibilita el anclaje de las pectinas y la celulosa, manteniéndolas juntas. A su vez, actúan como uniones potenciales entre las redes de pectina y la red de hemicelulosa-celulosa (Brummell, 2006).

- Ramnogalacturonano II (RG II) – es un heteropolímero de alta complejidad, formado por un esqueleto de (1,4)- α -D-galacturónico, cuyas cadenas laterales contienen diversos azúcares neutros en mayor o menor grado. Los RG II se conectan entre sí por uniones diéster borato (Brummell, 2006).

Los polímeros pécticos son los principales componentes de la lámina media, una región importante entre las paredes celulares que mantiene la adhesión entre las células y la sustentación de las células en los tejidos de los frutos (Redgwell y Fischer, 2002).

Las pectinas son el objeto de numerosas modificaciones que alteran sus conformaciones y su conexión con la pared. Muchos de los restos ácidos en las pectinas están esterificados con un grupo metilo, acetilo u otros no identificados. Esta esterificación ocurre en el aparato de Golgi y la unión éster puede ser escindida por las estererasas en la pared celular. La desesterificación modifica la carga eléctrica en la pared, lo cual puede influir en la actividad de las enzimas de la pared celular (Cosgrove, 1997b). La desesterificación también afecta las propiedades físicas de las pectinas, causando que las cadenas pécticas formen geles hidratados al unirse por uniones puentes de Ca^{2+} . Además, las pectinas pueden estar unidas unas a otras mediante enlaces covalentes, que incluyen los enlaces éster a través de los dímeros fenólicos tales como el ácido diferúlico (Fry, 1988).

En la última década, se propuso un nuevo modelo de organización de los polisacáridos de la pared celular en plantas dicotiledóneas, en el cual la diferencia principal radica en la unión entre las moléculas de pectinas (Vincken et al., 2003). En contraste con los modelos previos, en los cuales HG y RG I fueron previstos como polisacáridos separados o unidos por los extremos, el nuevo modelo propone que HG y otros componentes pécticos podrían funcionar como las cadenas laterales del RG I. De acuerdo a este modelo, los RG I están ligeramente alineados con las microfibrillas de celulosa, y el entrecruzamiento entre las moléculas de pectinas resultaría de los uniones diéster entre los dominios RG II, y de los puentes de Ca^{2+} entre dominios no esterificados de HG.

➤ **Proteínas estructurales** - En las plantas, se describieron y sistematizaron varias clases de las proteínas estructurales de acuerdo con su composición, es decir, con los aminoácidos predominantes. Muchas de estas proteínas están glicosiladas en mayor o menor grado. Típicamente, estas proteínas tienen una estructura primaria repetitiva y se

vuelven insolubles en las paredes durante la maduración de las células por los enlaces difenólicos entre las tirosinas (Cosgrove, 1997b). Entre las proteínas estructurales más conocidas de la pared celular vegetal se encuentran las extensinas o proteínas ricas en hidroxiprolina, las proteínas ricas en prolina, las proteínas ricas en glicina y las proteínas de arabinogalactanos. Las proteínas estructurales varían en su abundancia, dependiendo del tipo de célula, del estadio del desarrollo y/o de una estimulación previa que haya recibido la planta (heridas, ataques de agentes patógenos u otros seres vivos) (Cosgrove, 1997b).

1.6.2. Metabolismo de la pared celular durante la maduración de los frutos

La maduración de la mayoría de los frutos carnosos incluye una combinación de cambios texturales significativos y a veces drásticos, los cuales son usualmente agrupados bajo el término “ablandamiento” (Rose et al., 2003). Aún cuando el ablandamiento sea sólo uno de los muchos procesos resultantes de cambios bioquímicos que operan durante la maduración de los frutos, ostenta una importancia de primer orden, no solamente por su contribución a la calidad que determina el consumo de muchos frutos, sino también por dictaminar en muchos casos cuáles han de ser los procedimientos de manejo en postcosecha de estos productos. Debido al vínculo estrecho existente entre la textura y la calidad de los frutos, por una parte, y entre el ablandamiento en postcosecha, el ataque de agentes patógenos y la vida útil de los frutos por otra, los científicos pusieron particular énfasis en el estudio de los mecanismos implicados en la pérdida de firmeza (Brummell y Harpster, 2001). Como se comentó anteriormente las modificaciones de la pared celular han demostrado ser uno de los factores determinantes –aunque no el único– en el ablandamiento de los frutos (Giovannoni, 2001).

El ablandamiento de los frutos está acompañado por la despolimerización y solubilización de diferentes clases de polisacáridos de la pared celular tales como pectinas y glicanos de matriz, por la pérdida de azúcares neutros de la pared celular y, al mismo tiempo, por el elevado nivel de expresión de los ciertos genes, codificantes de proteínas/enzimas asociadas con la degradación de la pared celular (Brummell y Harpster, 2001; Giovannoni, 2001; Sozzi, 2004; Vicente et al., 2007; Bennett y Labavitch, 2008; Goulao y Oliveira, 2008; Li et al., 2010). Los trabajos recientes

indican que, al principio de la maduración, los cambios de pared celular catalizados por varias enzimas pueden regular y/o limitar las actividades de otras enzimas necesarias para el ablandamiento (Brummell y Harpster, 2001; Vicente et al., 2007). Sin embargo, se demostró que el principal determinante no es una sola proteína, sino un conjunto de proteínas que se encuentran implicadas en el ablandamiento de muchos frutos (Brummell y Harpster, 2001; Sozzi, 2004; Vicente et al., 2007; Bennett y Labavitch, 2008; Goulao y Oliveira, 2008). Hasta fines de la década de 1980 se señalaba a la poligalacturonasa (PG) y a la pectin metilesterasa (PME) como las principales enzimas responsables de los cambios en la pared celular que ocurren durante el ablandamiento de los frutos (Brummell y Harpster, 2001). Sin embargo, la supresión de la acumulación de transcritos de PG (Smith et. al., 2002) y de la actividad de PME (Thakur et al., 1996) en frutos “antisentido” de tomate demostró la contribución limitada que estas enzimas ejercen en el ablandamiento de ese fruto en particular (Brummell y Harpster, 2001).

La solubilización inicial de los polímeros pécticos durante la maduración en frutos con textura de tipo fundente, entre los que encuentran los frutos de Prunoideas (revisado por Brummell, 2006; ver además Ponce et al., 2010 y trabajos allí citados), y el kiwi (Redgwell y Fischer, 2002), no siempre está acompañada por cambios significativos en el tamaño de los polímeros que constituyen las pectinas. Por otra parte, la pérdida de los restos galactosilos, arabinosilos y otros de las cadenas pécticas es un evento importante, aunque no siempre se encuentra asociado con la solubilización de las pectinas durante el ablandamiento de los frutos, tal como se verifica en el caso del kiwi (Schröder y Atkinson, 2006).

1.6.3. Los cambios de la pared celular durante la maduración del kiwi

La mayoría de las investigaciones sobre modificaciones de la pared celular en kiwi se efectuaron utilizando el mesocarpo externo de frutos ‘Hayward’ previamente tratados con etileno. Los principales cambios registrados son la solubilización de las pectinas, la dilatación de la pared celular, la degradación de las pectinas, la reducción del peso molecular de los xiloglucanos y la disolución de la lámina media, todo lo cual conduce a la desintegración de la pared celular. Como se resumió anteriormente, esos cambios ocurren no sólo en kiwi, sino en la mayoría de los frutos que se ablandan hasta

alcanzar una textura fundente y suave (Brummell y Harpster, 2001; Brummell, 2006). Sin embargo, la forma en que se vinculan los cambios de la pared celular del kiwi con cada una de las etapas de ablandamiento, primero en ausencia de producción autocatalítica de etileno y, finalmente, acompañada por una biosíntesis de etileno masiva, es propia de este fruto.

En efecto, los cambios en la pared celular durante la maduración del kiwi ocurren en tres etapas principales, en coincidencia con los estadios del ablandamiento ya descritos (MacRae y Redgwell, 1992; Schröder y Atkinson, 2006). En el Estadio 1, el fruto se encuentra en una situación fisiológica apropiada para madurar, lo que en efecto sucede si se lo expone a etileno. Sin embargo, en ausencia de etileno, el fruto no se ablanda inmediatamente después de la cosecha. Cuando el fruto pasa al Estadio 2, ocurre la degradación del almidón, desesterificación (en coincidencia con un marcado incremento de actividad de la enzima PME), solubilización de las pectinas, y una dilatación (hinchamiento) de la pared celular (Redgwell et al., 1997a). El Estadio 2 se caracteriza por las grandes pérdidas de arabinosa y de galactosa, degradación de las pectinas solubles y disminución del peso molecular de los xiloglucanos (Redgwell et al., 1997b). Los frutos se ablandan hasta 20% respecto del grado de firmeza obtenido al momento de la cosecha. Finalmente, el climaterio respiratorio, la producción del etileno endógeno y la síntesis de los volátiles aromáticos están asociados con el Estadio 3. El ablandamiento continúa durante esta etapa hasta que el fruto pasa de la madurez de consumo (5-10% de la firmeza de cosecha) a la sobremadurez. Durante esta etapa final, se verifica una dilatación máxima de la pared celular con solubilización masiva de pectinas, que desemboca en la pérdida de la lámina media, lo que disminuye la adhesión entre las células y como resultado influye en la textura del fruto (Hallett et al., 1992).

1.6.4. Principales proteínas con o sin actividad enzimática demostrada que modifican polímeros de la pared celular

Existe una pléyade de proteínas con o sin actividad enzimática demostrada, que son responsables potenciales o actuales de la modificación de polímeros de la pared celular. A continuación se realiza una breve descripción de las enzimas que, además de ser investigadas en otros frutos, fueron estudiadas en kiwi por otros equipos de trabajo.

Asimismo, se refieren los antecedentes principales de las proteínas de pared celular, con o sin actividad enzimática demostrada, cuyos genes son objeto de estudio de esta Tesis.

➤ Enzimas que actúan sobre glicanos de matriz:

- **Endo-(1,4) β -D-glucanasas** (EGasas; EC 3.2.1.4). Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de cadenas de glucanos unidos por enlaces β -(1,4), adyacentes a restos de D-glucosa no sustituidos. A menudo, se hace referencia a estas enzimas como “celulasas”, sin embargo la mayoría de las EGasas carecen del dominio para poder unirse a microfibrillas de celulosa, como los dominios encontrados en las células microbianas. Por eso, no pueden degradar las microfibrillas de celulosa (Brummell et al., 1994). Así, en las paredes celulares, sus sustratos naturales posibles son los xiloglucanos y las regiones no cristalinas (vulgarmente conocidas como “amorfas”) de la celulosa (Brummell y Harpster, 2001). Se verificó la actividad de EGasas en frutos de diferentes especies, pero sólo en algunas se sugirió de forma convincente la existencia de un sustrato natural (Brummell et al., 1994). Por lo general, las EGasas poseen baja afinidad por los xiloglucanos, y diferentes aproximaciones utilizando frutos transgénicos antisentido de tomate, pimiento y frutilla no permitieron dilucidar el papel que desempeñan las EGasas (revisado extensamente por Sozzi, 2004).

- **Xiloglucano endotransglicosilasas** (XETs, EC 2.4.1.207). Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de la cadena β -(1,4)-D-glucano del xiloglucano, transfiriendo el extremo reductor recién formado a la posición C-4 del extremo no reductor de otra cadena de xiloglucano (Brummell y Harpster, 2001). En kiwi, la actividad de la XET se caracterizó bioquímica y fisiológicamente (Redgwell y Fry, 1993; Percy et al., 1996; Schröder et al., 1998). La actividad por unidad de peso fresco es 42 veces más elevada en la columela que en el mesocarpo externo. La actividad se incrementa en todos los tejidos luego de un tratamiento de 24 h con etileno, aunque el incremento es mucho mayor en el mesocarpo externo. También se observó una marcada dilatación de la pared celular 24 h después de la detección del incremento inicial de la actividad de XET, lo que sugeriría un rol relacionado con la dilatación de la pared celular, preparatoria de otros cambios (Redgwell y Fry, 1993). El kiwi es uno de los escasísimos ejemplos en los que se ha encontrado in vitro una actividad xiloglucano endohidrolítica para XET (Schröder et al., 1998). Asimismo, como los mananos tienen un rol estructural análogo al de los xiloglucanos, también se estudió la presunta

existencia de una manano transglicosilasa, encontrándose la actividad más elevada en flores de kiwi (Schröder et al., 2004).

- **β -D-xilosidasas** (β -Xil; EC 3.2.1.37). Son enzimas que catalizan la liberación de xilosa a partir de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos generados por las endo- β -1,4-D-xilanasas. La hidrólisis completa de los arabinoxilanos de la pared celular requeriría de la acción de endo- β -1,4-D-xilanasas o de β -1,4-xilano endohidrolasas (EC 3.2.1.8), como también de β -Xil. Esta enzima no fue estudiada en detalle en frutos, pero su presencia se detectó en paltas, tomates, peras europeas y japonesas, ciruelas, damascos, duraznos y aceitunas (ver Sozzi, 2004 y referencias allí incluidas). También se observó actividad de β -Xil en kiwi (Boquete et al., 2004), la cual se incrementa marcadamente durante la maduración de los frutos. La aplicación de 1-MCP $1 \mu\text{L L}^{-1}$ disminuye significativamente la actividad de β -Xil, lo que implicaría que el etileno podría desempeñar un papel en su modulación (Boquete et al., 2004). Un gen codificante para una enzima que degrada xilanos mostró, mediante un análisis de microarreglos, un pico de expresión 168 h después del inicio de un tratamiento con etileno (Atkinson et al., 2011).

➤ Enzimas que actúan sobre glicanos de matriz y/o pectinas:

- **β -D-Galactosidasas** (β -Gal, EC 3.2.1.23). En las plantas superiores, son enzimas de tipo “exo” capaces de remover los restos β -D-galactosilos a partir de los extremos no reductores de las cadenas laterales de los RG I, los cuales poseen por lo general la mayor parte de los restos de galactosa de la pared celular. Así, aumenta la solubilidad de los RG I, y se incrementa la porosidad de la pared celular; además, se considera que la actividad de β -Gal puede facilitar el acceso de PME y PG a sus sustratos (Brummell y Harpster, 2001). β -Gal también puede actuar en ciertos casos como β -galactanasa. El tema se desarrolla más ampliamente en la sección 1.6.5.

- **α -L-Arabinofuranosidasas** (α -Ara, EC 3.2.1.55). Son exoglicosidasas que catalizan la hidrólisis de los restos terminales no reductores de polímeros pécticos y hemicelulósicos, liberando arabinosa (Beldman et al., 1997; Saha, 2000; Sozzi, 2004). Algunas α -Ara pueden actuar in vivo como arabinasas. Por otra parte, algunas enzimas actúan de forma bifuncional (α -Ara/ β -Xil) sobre sustratos de síntesis, pero lo hacen únicamente como α -Ara sobre sustratos naturales aislados de frutos (Tateishi et al., 2005). El tema se desarrolla más extensamente en la sección 1.6.5.

➤ Enzimas que actúan sobre pectinas:

- **Pectato liasas** (PL, EC 4.2.2.2). Son enzimas que catalizan la ruptura de uniones α -1,4-galacturonosidas en pectinas desesterificadas mediante un mecanismo de eliminación beta en presencia de Ca^{2+} , produciendo oligosacáridos con restos de ácido galacturónico no saturado en el extremo no reductor. El tema se desarrolla in extenso en la sección 1.6.6.

- **Poligalacturonasas** (PG). Son enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de las uniones α -(1,4) de los restos de ácido galacturónico, y pueden ser de acción exo o endo. Las exo-PG (EC 3.2.1.67) remueven unidades simples de ácido galacturónico del extremo no reductor del ácido poligalacturónico, mientras que las endo-PG (EC3.2.1.15) clivan dicho polímero en posiciones internas al azar (Brummell y Harpster, 2001). En kiwi, se caracterizó la expresión de tres ADNc de PG (*CkPGA*, *CkPGB* y *CkPGC*) aisladas del fruto de *A. chinensis* (Wang et al., 2000). La expresión de *CkPGA* y *CkPGB* se detectó solamente en frutos que producían etileno. Por su parte, y utilizando RT-PCR, se observó la expresión del gen *CkPGC* en frutos en ablandamiento que, al atravesar la etapa del climaterio, alcanzó niveles máximos 50 veces mayores que los de *CkPGA* y *CkPGB*. Sin embargo, la expresión de este gen también se detectó durante el desarrollo del fruto y en frutos recolectados antes del inicio del ablandamiento. Estos resultados podrían sugerir que la expresión de los genes codificantes de PG en kiwi se requeriría no sólo durante los períodos de degradación de la pared celular del fruto, sino también durante las etapas de expansión (Wang et al., 2000). Un gen de PG se expresó luego de 12 h de tratamiento con etileno (Atkinson et al., 2011).

- **Pectin metilesterasas** (PME; EC 3.1.1.11). Son enzimas que catalizan la desmetilación del grupo carboxilo en la posición C-6 de los restos de ácido galacturónico de las pectinas de alto peso molecular. Esta desmetilación cambia el pH y la carga de la pared celular, permitiendo la agregación de los poliuronidos en la estructura del gel, y volviendo a aquéllos más susceptibles a la degradación por PG (Brummell y Harpster, 2001). En kiwi, se estudiaron las propiedades estructurales de una pectinmetilesterasa (Ciardiello et al., 2008). Su actividad resulta inhibida por interacción con un inhibidor proteico denominado PMEI, aislado del mismo fruto. El complejo PME/PMEI de kiwi es muy estable en un rango amplio de pH y se disocia únicamente a pH 10, a diferencia de lo observado en la PME de tomate (Ciardiello et

al., 2008). El inhibidor se mantiene estable entre 20 y 40 °C, por lo cual es potencialmente interesante para la inhibición de la enzima en la industria de jugos (Hao et al., 2008). Un inhibidor de PME se expresa en kiwi luego de 24 h de tratamiento con etileno (Atkinson et al., 2011).

➤ Proteínas sin actividad enzimática conocida:

- **Expansinas (Exp).** Son proteínas localizadas en la pared celular, sin actividad enzimática acreditada. Probablemente actúan causando una ruptura irreversible de los puentes de hidrogeno entre las microfibrillas de celulosa y los polisacáridos de la matriz, particularmente los xiloglucanos, favoreciendo la relajación de la pared celular al permitir el deslizamiento de unas microfibrillas respecto de otras, impulsado por la presión de turgencia (Brummell y Harpster, 2001). El tema se desarrolla más extensamente en la sección 1.6.7.

1.6.5. Características generales de las α -L-arabinofuranosidasas y β -D-galactosidasas

La arabinosa y la galactosa son componentes abundantes de la pared celular, constituyentes ambos de las pectinas y de los glicanos de matriz (O'Neill y York, 2003). Los restos arabinosilos y galactosilos están presentes de forma conspicua en polisacáridos pécticos tales como los arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (ramificaciones laterales del RG I integradas por arabinosa sola, galactosa sola o por galactosa y arabinosa, respectivamente). En polisacáridos hemicelulósicos, la arabinosa está presente en los arabinoxilanos (polímeros con un esqueleto de restos xilosilos con uniones β -1,4, sustituidos con restos arabinosilos laterales unidos mediante uniones α -1,2), arabinoxiloglucanos (polímeros de restos glucosilos unidos con uniones β -1,4, sustituidos por restos de xilosa en unión α -1,6, seguidos de arabinosa en unión α -1,2) y glucuronoarabinoxilanos (conformados por un esqueleto principal de xilosas unidas por uniones β -1,4, sustituidas por ácido glucurónico y arabinosa, ambos en uniones α -1,2) (Beldman et al., 1997; Saha, 2000; Sozzi et al., 2002). Asimismo, la galactosa puede formar parte de las cadenas laterales de otros glicanos, como los galactomananos (conformados por cadenas principales de manosa con uniones β -1,4, con unidades de galactosa en posiciones O-6) o los galactoglucomananos (conformados por cadenas principales de manosa y glucosa unidas por uniones β -1,4, con unidades de galactosa en

posiciones *O*-6). En estos últimos dos casos, la galactosa se une por uniones α -1,4, por lo cual se requeriría una α -galactosidasa para su clivaje.

La pérdida de los restos de azúcares neutros en la pared celular fue observada durante la maduración de diferentes frutos, aunque el nivel de pérdida y la especificidad del azúcar liberado depende altamente de la especie, y hasta de la variedad considerada (Gross y Sams, 1984; Redgwell et al., 1997b).

En el kiwi, los estudios recientes demostraron que el inicio de la pérdida de galactosa de la pared celular es uno de los primeros eventos durante el complejo programa de ablandamiento del fruto. Las pérdidas de galactosa ocurren particularmente de las ramas de galactanos unidos fuertemente a la pared celular, con pérdidas menores a partir de pectinas más fácilmente solubles (Ross et al., 1993). Sin embargo, se han encontrado pérdidas de galactosa importantes tanto en fracciones hemicelulósicas (Redgwell et al., 1997b) como en fracciones pécticas (Li et al., 2006).

Como se señaló anteriormente, las enzimas α -Ara y β -Gal catalizan la hidrólisis de restos arabinosilos y galactosilos terminales, respectivamente. Sus actividades se detectaron en una amplia gama de frutos (revisado por Sozzi, 2004), pero no se estudió en detalle en la mayoría de ellos. Entre los ejemplos principales de frutos de especies leñosas y semileñosas, se informaron incrementos en la actividad de α -Ara y/o de β -Gal (correlacionados con pérdidas importantes de arabinosa y/o galactosa de la pared celular) en manzana (Yoshioka et al., 1995; Goulao et al., 2007), pera japonesa (Tateishi et al., 1996, 2005) y europea (Trinchero et al., 2004), palta (Tateishi et al., 2001a), tomate (Sozzi et al., 1998, 2002), kaki (Xu et al., 2003) y durazno (Brummell et al., 2004). En kiwi, Ross et al. (1993) purificaron la β -Gal de kiwi y mostraron que la enzima es capaz de liberar galactosa in vitro de una amplia variedad de polisacáridos de la pared celular, y particularmente de galactanos de alto peso molecular, pectinas covalentemente unidas a la pared celular y galactoglucomananos. También en el kiwi, Boquete et al. (2004) observaron un incremento de actividad de α -Ara y de β -Gal durante el último estadio de maduración del fruto, etapa que se caracteriza por la solubilización de pectinas y la dilatación de la pared celular (Gallego y Zarra, 1997; Redgwell et al., 1997a, 1997b; Li et al., 2006). En forma concomitante con el aumento en la liberación de galactosa durante la maduración, Ogawa et al. (1990) informaron un aumento en la actividad de β -Gal de cinco veces, observándose el pico al alcanzar la madurez de cosecha. Durante la maduración del fruto en postcosecha, Wegzyn y

MacRae (1992) detectaron pocos cambios en la actividad de esta enzima, en tanto que Boquete et al. (2004) mostraron incrementos de la actividad de β -Gal de más de 100% durante la pérdida de firmeza del fruto, desde su salida de cámara con 37 N hasta su ablandamiento completo. Estos incrementos resultaron inhibidos por la aplicación de 1-MCP $0,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Boquete et al., 2004).

Asimismo, se clonaron total o parcialmente diversos genes codificantes de α -Ara, α -Ara/ β -Xil (putativamente codificante de una enzima bifuncional) y β -Gal en varias especies (Smith et al., 1998, 2002; Smith y Gross, 2000; Tateishi et al., 2001b, 2005; Itai et al., 2003; Mwaniki et al., 2005; Hayama et al., 2006; Goulao et al., 2008; Di Santo et al., 2009). En algunos casos, como sucede en tomate (Smith y Gross, 2000), la enzima β -Gal actúa a su vez como endo-galactanasa, aumentando así la velocidad de hidrólisis de los galactanos de pared celular al clivarlos internamente al azar.

Resulta particularmente interesante observar que la expresión de los genes de β -Gal y α -Ara varía con la especie y dentro de la misma especie, como sucede en tomate (Smith y Gross, 2000). En árboles frutales leñosos, mientras que un gen de α -Ara de pera japonesa (que también detenta in vitro actividad de β -Xil) se expresa exclusivamente durante la maduración (Tateishi et al., 2005), un gen putativo de α -Ara/ β -Xil de durazno (Hayama et al., 2006) no se expresa exclusivamente en dicho estadio, acumulando sus transcriptos en otras etapas ontogénicas como, por ejemplo, en la fase de división celular (Di Santo et al., 2009). Sin embargo, no se han clonado ni se han evaluado las expresiones de α -Ara y β -Gal en kiwi, desconociéndose además las potenciales diferencias espaciales (entre tejidos), temporales (a través de su ontogenia), y su eventual especificidad (expresión en frutos únicamente, o en diferentes órganos vegetales).

1.6.6. Características generales de las pectato liasas

La degradación de las pectinas es uno de los procesos que ocurre durante el ablandamiento de los frutos mediante la acción de varias enzimas pectolíticas, tales como las endo- y exo-PG, las PME, las pectin acetilesterasas, β -Gal, α -Ara y PL. Las PL son enzimas que catalizan la ruptura de pectinas desesterificadas mediante un mecanismo de eliminación beta en presencia de Ca^{2+} , produciendo oligosacáridos con restos de ácido galacturónico no-saturados en el extremo no-reductor (Yoder et al.,

1993). Estas enzimas se estudiaron ampliamente en las bacterias patógenas de las plantas y la acción de estas enzimas resulta en la maceración de los tejidos vegetales en la mayoría de los cultivos hortícolas (Collmer y Keen, 1986; Kotoujansky, 1987; Kobayashi et al., 1999). Las PL fueron encontradas en el polen, anteras, pistilos y durante la formación de los elementos de las tráqueas en el sistema de células del mesófilo (Wing et al., 1989; Kulikauskas y McCormick, 1997; Domingo et al., 1998; Milioni et al., 2001). Se identificó que el polen del cedro asiático (Taniguchi et al., 1995) y las células cultivadas de *Zinnia* en estado de elongación y diferenciación (Domingo et al., 1998) tienen actividad de PL.

También se informó la expresión de los genes codificantes de PL en varios órganos y tejidos de plantas superiores, incluyendo los frutos maduros de especies tales como banano (Domínguez-Puigjaner et al., 1997; Medina-Suárez et al., 1997; Pua et al., 2001), frutilla (Medina-Escobar et al., 1997) y vid (Nunan et al., 2001). La presencia de la actividad enzimática de PL en frutos carnosos se demostró por primera vez en el tejido de banana madura junto con la expresión de dos genes *Pel* relacionados con la maduración del dicho fruto (Marín-Rodríguez et al., 2003).

El estudio de las enzimas que degradan los polímeros pécticos se enfocó principalmente en las PG, y las PL fueron prácticamente ignoradas durante mucho tiempo en el proceso de maduración de los frutos. Sin embargo, la importancia de estas enzimas fue apreciada recientemente como resultado de la secuenciación del genoma y los programas EST. En kiwi, un gen codificante de PL se expresó 24 h después de iniciado el tratamiento con etileno (Atkinson et al., 2011). Además, se informó que la inhibición de la expresión del gen codificante a una PL en plantas transgénicas de frutilla posibilitó la retención de la firmeza de los frutos por más tiempo (Jiménez-Bermúdez et al., 2002). Estos datos sugieren fuertemente que el rol de las enzimas PL en el ablandamiento de los frutos es más importante de lo se pensó inicialmente.

1.6.7. Características generales de las expansinas

Las Exp son proteínas capaces de inducir la extensión y relajación de las paredes celulares vegetales de forma dependiente del pH. Se cree que, durante el ablandamiento, las Exp promueven la relajación de las estructuras de la pared celular, a través de la ruptura de las uniones puente de hidrógeno entre las fibrillas de celulosa y los glicanos

de matriz, permitiendo el acceso de diferentes hidrolasas a sus sustratos (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994).

La superfamilia de Exp de plantas está organizada en 4 familias: α -expansinas (EXPA), filogenéticamente relacionadas al primer grupo de Exp descubiertas en pepino (McQueen-Mason et al., 1992); β -expansinas (EXPB), relacionados al grupo 1 de alérgenos del polen del pasto (Kende et al., 2004); expansinas-tipo-A (EXPLA) y expansinas-tipo-B (EXPLB), descubiertas recientemente mediante las búsquedas en bases de datos y el análisis filogenético de las secuencias (Sampedro y Cosgrove, 2005). Se demostró experimentalmente que las proteínas EXPA y EXPB causan pérdidas en la pared celular, están involucrados en la expansión celular y también en otros eventos del desarrollo durante los cuales ocurren las modificaciones de la pared celular. Las proteínas de estas dos familias están fuertemente unidas a la pared celular y su acción es típicamente ensayada por su estimulación de la extensión de la pared celular y la relajación de la tensión. La función biológica de EXPLA y EXPLB todavía no se comprobó (Sampedro y Cosgrove, 2005; Choi et al., 2006).

Las Exp actúan muy rápido, induciendo la extensión en cuestión de segundos, pero no afectan la plasticidad o elasticidad de la pared celular (Yuan et al., 2001). De este modo, el efecto de las Exp sobre la pared celular es distinto al efecto que causan las enzimas hidrolíticas.

La acción de las Exp principalmente está asociada con las pérdidas de pared celular en las células en crecimiento. Esta conexión fue confirmada y ampliada con los experimentos con las plantas transgénicas en las cuales se manipuló la expresión de los genes (Sampedro y Cosgrove, 2005). En la mayoría de los casos, el silenciamiento de los genes codificantes para Exp lleva a la inhibición del crecimiento, mientras que la sobreexpresión conduce a un crecimiento más rápido o anormal. La expresión localizada de las Exp está asociada con los meristemas y las zonas de crecimiento de las raíces y los tallos, como también con la formación de los primordios foliares en los meristemas apicales de los tallos (Reinhardt et al., 1998). Adicionalmente, las Exp están implicadas en otros procesos del desarrollo de las plantas tales como la formación de xilema (Gray-Mitsumune et al., 2004), la abscisión (Belfield et al., 2005), la germinación de las semillas (Chen y Bradford, 2000), la penetración de los tubos polínicos a través del estigma y estilo (Cosgrove et al., 1997; Pezzotti et al., 2002). Además, se encontraron Exp específicamente relacionadas con la maduración de los

frutos y estrechamente asociadas con el ablandamiento: *LeEXP1* en tomate (Rose et al., 1997), *FaEXP2* en frutilla (Civello et al., 1999), *Pa-EXP1* de damasco (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 2002), *PchEXP1* y *PpEXP3* en durazno (Hayama et al., 2000, 2003), *PcExp2* y *PcExp3* en pera europea (Hiwasa et al., 2003b), *MaEXP1* en banana (Trivedi y Nath, 2004), *MiExpA1* en mango (Sane et al., 2005), *Vlexp3* de uva (Ishimaru et al., 2007), *VpEXPA2* de papaya de montaña (Gaete-Eastman et al., 2009).

En kiwi, se aislaron dos genes codificantes de Exp, *AdEXP1* y *AdEXP2*, de un fruto maduro del cultivar Bruno (Yang et al., 2007). Asimismo, se determinó que *AdEXP1* y *AdEXP2* pertenecen a la familia EXPA, subgrupos A y B, respectivamente. Sin embargo, ambos miembros comparten un patrón de expresión similar, aunque no idéntico, durante la maduración del kiwi. La expresión de ambos genes resultó modulada positivamente por un tratamiento con etileno y negativamente por un tratamiento con ácido acetilsalicílico. Estos resultados sugieren que *AdEXP1* y *AdEXP2* pueden estar involucrados en la maduración del kiwi. Sin embargo, se desconoce la expresión de estos genes durante la ontogenia del fruto y en otros órganos, como así también el grado de dependencia de su expresión en el fruto del etileno y su respuesta al 1-MCP.

1.7. Hipótesis de trabajo y objetivos

El kiwi es un fruto climatérico que, sin embargo, posee un comportamiento no climatérico a temperaturas inferiores a 10 °C. Además, el fruto se torna extremadamente sensible al etileno mucho tiempo antes de ser capaz de producir etileno autocatalíticamente, todo lo cual hace de él un sistema único para los estudios de fisiología de la maduración. El ablandamiento del kiwi se inicia con significativa antelación a la aparición del climaterio, y se asocia con cambios marcados en el metabolismo de la pared celular, pero el 1-MCP podría ser capaz de bloquear los cambios conducentes a la pérdida de firmeza del kiwi. Hasta hoy, se desconocen en detalle muchos de los genes asociados a los cambios que ocurren en la pared celular, lo que justifica la profundización de las investigaciones en torno a los alcances de la acción del 1-MCP, como también en relación a la expresión de los genes codificantes de enzimas de pared celular.

1.7.1. Hipótesis

A partir de los puntos señalados se plantearon las siguientes hipótesis:

1. El 1-MCP produce una inhibición diferencial sobre la expresión de los genes codificantes de ACS y ACO, tanto espacial (en tejidos de mesocarpo externo y columela) como temporal (bajo diferentes condiciones de postcosecha) y un retraso en el ablandamiento del kiwi, aún en estados avanzados de maduración.
2. Existen distintos genes putativamente codificantes de las enzimas β -Gal, α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp de la pared celular, cuya expresión es diferente según el estado ontogénico, el tejido/órgano objeto de estudio y el grado del ablandamiento del fruto.
3. La expresión de los genes codificantes de β -Gal, α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp podría resultar modulada por diferentes reguladores del crecimiento (etileno y 1-MCP) durante el ablandamiento del kiwi.

1.7.2. Objetivo General

Considerando las hipótesis planteadas, el objetivo general de la Tesis consistió en identificar y evaluar la expresión de genes codificantes de enzimas asociadas a los

procesos de desarrollo y ablandamiento en kiwi, con particular énfasis en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la pared celular, tanto durante la ontogenia como bajo la influencia de diferentes condiciones de manejo en postcosecha.

1.7.3. Objetivos Específicos

A partir de las hipótesis planteadas, se formularon para esta Tesis los siguientes objetivos específicos:

1. Investigar la acción del 1-MCP, inhibidor de la acción del etileno, sobre la expresión de los genes codificantes de ACS y ACO de kiwi bajo diferentes condiciones y en distintos momentos de postcosecha, y sus consecuencias en el ablandamiento del kiwi y en la síntesis del etileno.
2. Identificar y clonar el gen codificante de la β -Gal en kiwi, y evaluar la expresión de éste y otros genes codificantes de α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp durante el crecimiento, la maduración y el ablandamiento de los frutos, tanto en mesocarpo externo como en columela.
3. Estudiar la modulación de la expresión de los genes de β -Gal, α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp en kiwi, bajo diferentes condiciones de manejo en postcosecha (exposición o no al etileno y al 1-MCP).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se utilizaron dos cultivares de kiwi: Hayward y Bruno. Los frutos de ambos cultivares presentan un patrón de maduración muy similar y son igualmente sensibles al etileno y al 1-MCP.

Los experimentos referidos a la expresión de los genes codificantes de ACC sintasa y ACC oxidasa (Experimentos 1, 2 y 3) se efectuaron con el cultivar Hayward, porque se requirió un número de frutos elevado a fin de poder evaluar el efecto del etileno y del 1-MCP, aplicados en diferentes momentos de su conservación en cámara fría. Para determinar la incidencia de factores de precosecha en la respuesta al 1-MCP, se utilizaron frutos provenientes de fincas ubicadas en diferentes regiones. Cabe aclarar que la inmensa mayoría de los montes frutales con kiwi en la Argentina corresponden al cultivar Hayward, esto justifica en buena medida su utilización en este ensayo.

Para estudiar la expresión de los genes codificantes de enzimas de pared celular (Experimentos 4, 5, 6, 7 y 8), se utilizó el cultivar Bruno, ya que se requirió el seguimiento de los frutos durante toda la ontogenia (más de 180 d), la maduración y el ablandamiento, lo que implicó la necesidad de disponer de los frutos inmediatamente. Para ello, se utilizaron los frutos provenientes del Monte Frutal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, que cuenta con plantas maduras del cultivar Bruno. Este monte se sitúa en la cercanía del laboratorio, lo que permitió el seguimiento diario de los frutos en planta. Asimismo, se trabajó con órganos florales, raíces y hojas.

Como se mencionó en la Introducción, el mesocarpo del kiwi se divide en interno, que contiene los lóculos con las semillas, y externo. Debido a las dificultades operativas que genera la separación de las semillas del tejido, se decidió trabajar solamente con el mesocarpo externo (en adelante, se entenderá el término ‘mesocarpo’ como mesocarpo externo del fruto).

2.2. Experimentos

2.2.1. Experimento 1: Aplicación de 1-MCP o de etileno con posterior almacenamiento de los frutos a 20 °C. Evaluación de la producción de etileno, la firmeza y la expresión de los genes *KWACS1*, *KWACS2* y *KWACO1*

Durante la temporada del año 2007, se cosecharon los frutos de kiwi ‘Hayward’ con madurez comercial (peso promedio = 102 g; sólidos solubles promedio = 7%) de huertos localizados en dos regiones: en Mar del Sur (38°19’S 57°59’W) y en Baradero (33°49’S 59°24’W), provincia de Buenos Aires, Argentina. La distancia entre las dos plantaciones es aproximadamente de 517 km. Los frutos de Mar del Sur tenían una firmeza promedio de 88,5 N mientras que la de los frutos de Baradero era de 87 N. Se almacenaron los frutos a temperatura ambiente durante 24 h luego de la cosecha para que la cicatriz del tallo desarrolle una barrera física contra *Botrytis cinerea* (Pennycook y Manning, 1992). Luego los frutos libres de deterioro y sin defectos fueron separados al azar en grupos de 100 frutos por cada tratamiento y región. Esto constituyó la unidad experimental (en adelante, “grupo de frutos”).

De esta manera, diferentes grupos de frutos fueron almacenados a 20 ± 2 °C (Experimento 1), o enfriados con aire forzado y conservados en cámaras a $0 \pm 0,5$ °C y 90% de humedad relativa durante 40, 80 o 120 d (Experimento 2 y 3).

En el Experimento 1, distintos grupos de frutos fueron conservados como: a) controles no tratados, o b) tratados con $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP, o c) tratados con $10 \mu\text{L L}^{-1}$ de etileno durante 24 h. Cada grupo de frutos fue colocado en contenedores de acero inoxidable.

La metodología de la aplicación de tratamientos fue la misma para todos experimentos. El **tratamiento con 1-MCP** se realizó utilizando recipientes (“viales”) de 50 mL con tapa hermética, conteniendo una cantidad exacta de polvo SmartFresh™ (0,14% de ingrediente activo, Rohm y Haas, Argentina) a los que se agregó posteriormente agua tibia (40 °C). Cada frasco se agitó y ubicó en el cajón que contenía los frutos, luego se removió la tapa del vial, y por último se colocó la cubierta del contenedor en un plazo de 10 s. La tapa de cada contenedor fue sellada para asegurar el

cierre hermético. La atmósfera en el contenedor fue controlada por un sistema comercial de intercepción de CO₂ que contiene pellets de NaOH para disminuir la acumulación de CO₂, como fue descrito previamente (Boquete et al., 2004). El **tratamiento con etileno** se realizó mediante inyección de 10 µL L⁻¹ de etileno en aire humidificado usando un sistema de flujo de gas constante, como se describió previamente (Sozzi et al., 1999). Los frutos tratados con etileno se colocaron en un habitáculo de 60 m³, ventilado de forma forzada con aire libre de etileno, siguiendo un protocolo ya establecido (Mathooko et al., 1995; Sozzi et al., 1999). Este procedimiento duró 24 h, para asegurar la difusión hacia el exterior y eliminación del etileno absorbido por los frutos durante el tratamiento. En el **tratamiento control**, los frutos se mantuvieron en las mismas condiciones que los frutos tratados pero sin aplicación de 1-MCP o etileno.

Después de transcurridas 24 h de la aplicación de los tratamientos a 20 ± 2 °C, los contenedores se ventilaron y los grupos de frutos se almacenaron en aire a 20 ± 2 °C y 90 % de humedad relativa durante 28 d. Se realizaron mediciones de producción de etileno y de firmeza (ver procedimiento detallado en la sección 2.3.2) de cada fruto individualmente, en diferentes momentos del almacenamiento: d 1, 4, 8, 14, 21, 24 y 28. Además, de frutos provenientes de Mar del Sur se tomó muestras del mesocarpo y de la columela, como se describe en la sección 2.3.3 para futuras extracciones de ARN mensajero (ARNm).

Con el fin de evaluar el efecto sobre la producción de etileno endógeno en los frutos tratados con etileno o con 1-MCP con respecto a los controles, se estudió la expresión de los genes codificantes de las dos principales enzimas de los últimos pasos de la ruta de la síntesis del etileno: ACS y ACO. En las bases de datos (GenBank) se encontraron secuencias de los genes *KWACS1* (*Actinidia deliciosa*, número de acceso del GenBank AB005722), *KWACS2* (*Actinidia deliciosa*, AB005723) y *KWACO1* (*Actinidia deliciosa*, AB003514), a partir de las cuales se diseñaron ‘primers’ específicos para estimar las acumulaciones de transcritos de dichos genes, en forma semicuantitativa, mediante la técnica de reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR). Las condiciones de amplificación y las secuencias de los ‘primers’ están detalladas en las secciones 2.3.9 y 2.3.10. Para verificar si los fragmentos amplificados correspondían a los genes de interés, se purificaron de los geles de agarosa, se clonaron en el vector pGEM-T y se secuenciaron. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron mediante el programa BLASTN.

Un procedimiento similar de muestreo y estudio de la expresión de los genes *KWACSI*, *KWACS2* y *KWACOI* se realizó en frutos de Mar del Sur del experimento 2 que fueron conservados a 0 ± 5 °C durante 40 d, y en frutos del experimento 3.

2.2.2. Experimento 2: Aplicación de 1-MCP después de 40, 80 o 120 días de conservación a 0 °C y posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la producción de etileno, la firmeza y la expresión de los genes *KWACSI*, *KWACS2* y *KWACOI*

Se conservaron grupos de frutos de Mar del Sur, similares a los utilizados en el experimento 1, a 0 ± 5 °C y 90% de humedad relativa durante 40, 80 o 120 d. Posteriormente algunos grupos de frutos fueron tratados con $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 0 ± 5 °C, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (ver sección 2.2.1), y otros grupos no tratados se utilizaron como controles. Luego los frutos fueron transferidos a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) para su ablandamiento mientras se controlaba su estado con mediciones periódicas de la producción de etileno y la determinación de firmeza los días 1, 5, 9, 12, 15, 18, 22, 24 y 28.

2.2.3. Experimento 3: Aplicación de 1-MCP después de 40 y 80 días de conservación a 0 °C y posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la producción de etileno, la firmeza y la expresión de los genes *KWACSI*, *KWACS2* y *KWACOI*

Se conservaron grupos de frutos de Mar del Sur, de características similares a aquellas del experimento 1, a 0 ± 5 °C y 90% de humedad relativa durante 80 d. Este experimento consistió en la aplicación de $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de 1-MCP a 0 ± 5 °C en dos ocasiones, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (ver sección 2.2.1). La primera aplicación de 1-MCP se realizó luego de transcurridos 40 d en cámaras a 0 ± 5 °C, y la segunda a la salida luego de transcurrir otros 40 d de conservación a 0 ± 5 °C. Se utilizaron frutos no tratados como controles y se conservaron en las mismas condiciones de temperatura, pero sin aplicación del 1-MCP. Por último, los frutos fueron transferidos a temperatura ambiente a 20 ± 2 °C para su ablandamiento con el

seguimiento de su estado realizando mediciones periódicas de producción de etileno y determinación de la firmeza los días 1, 5, 9, 12, 15, 18, 22, 24 y 28.

2.2.4. Experimento 4: Obtención de las secuencias de *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *Actina*, *AdEXP1* y *AdEXP2*

2.2.4.1. Obtención de la secuencia completa del gen *AdGAL1*

Se realizó una búsqueda de secuencias codificantes de β -Gal de kiwi en las bases de datos (GenBank) a fin de poder estudiar la expresión del gen codificante de esta enzima. Como no se encontraron datos publicados, se diseñaron dos ‘primers’ degenerados, BGALF1 y BGALR1, a partir del alineamiento de las secuencias provenientes de otros frutos, cuya expresión fue detectada particularmente en la maduración. Para el alineamiento se utilizaron las secuencias localizadas en el GenBank: *JP-GAL* de pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*, Numero de acceso GenBank: AB046543), *AV-GAL* de palta (*Persea americana*, AB061017), *SP26* de mango (*Mangifera indica*, AF004812), *TBG4* de tomate (*Lycopersicon esculentum*, AF020390) y *pABG1* de manzana (*Malus x domestica*, L29451). Luego, mediante la técnica de RT-PCR a partir de una muestra de mesocarpo de un kiwi maduro, se amplificó un fragmento de ADN. Este se purificó del gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T y se secuenció. La secuencia de nucleótidos de 328 pb se analizó por el programa BLASTN, demostrándose la homología con β -Gal de otros frutos. Sobre la base de esta secuencia obtenida, se diseñaron otros ‘primers’: BGALF2 y BGALR2, BGALF3 y BGALR3 a fin de obtener fragmentos más largos de la secuencia del gen de interés (Figura 2.1).

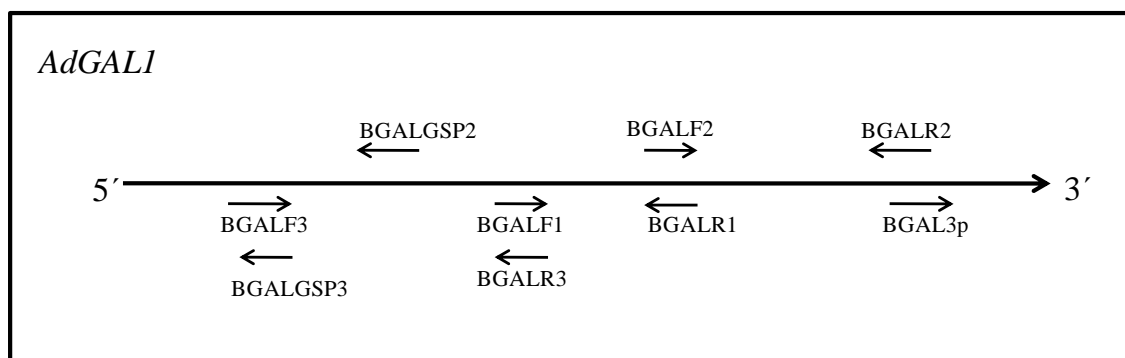


Figura 2.1 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia completa de *AdGAL1*.

Las flechas indican la dirección de los ‘primers’.

Se realizaron varias reacciones de PCR con algunas modificaciones del programa (sección 2.3.9): el tiempo de hibridación fue de 1 min 30 s, y el tiempo de elongación fue de 1 min 20 s. Se amplificaron dos nuevos fragmentos, cuales fueron purificados del gel de agarosa, clonados en el vector pGEM-T y secuenciados. Las secuencias obtenidas contenían 730 y 668 pb.

Para obtener los extremos de la secuencia de interés se empleó la técnica de RACE-PCR utilizando los kits comerciales RACE 5' y 3' (Invitrogen Corporation, EE.UU.). Para la amplificación del extremo 5' se siguió el protocolo descrito en la sección 2.3.11, utilizando el ‘primer’ BGALR3 como el GSP1 para la síntesis de ADNc, y los ‘primers’ específicos BGALGSP2 y BGALGSP3 para la primera y la segunda reacciones de PCR, respectivamente (Figura 2.1). La amplificación del extremo 3' se realizó siguiendo el protocolo detallado en la sección 2.3.12, utilizando como el ‘primer’ GSP - BGAL3p. Para la amplificación de los fragmentos se utilizó la enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen Corporation, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Las bandas de interés se purificaron del gel, se clonaron en el vector pGEM-T y se secuenciaron. Todos los fragmentos obtenidos se alinearon en el programa Vector NTI (Invitrogen Corporation, EE.UU.), se unieron por solapamiento resultando en una secuencia completa que se denominó posteriormente *AdGAL1*.

2.2.4.2. Obtención de la secuencia parcial del gen *AdARF/XYL1*

A fin de obtener un fragmento de secuencia codificante de una α -Ara/ β -Xil de kiwi, de la cual no se encontraron ejemplos registrados en las bases de datos del GenBank, se alinearon las secuencias de esta enzima perteneciente a otros frutos. Se utilizaron los clones: *PpARF/XYL* de durazno (*Prunus pérsica*, número de acceso GenBank: AB264280) y *PpARF2* de pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*, AB195230) y *FaXyl1* codificante a una β -Xil de frutilla (*Fragaria x ananassa*, AY486104), y se diseñaron dos ‘primers’ AX1F y AX1R de la zona más conservada de estas secuencias.

El producto amplificado mediante la técnica de RT-PCR se purificó del gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T y se secuenció. La secuencia de nucleótidos contenía 685 pb y se verificó mediante el programa BLASTN. Se diseñaron otros pares de ‘primers’: AX2F y AX2R, AX3F y AX3R, AX4F y AX4R (Figura 2.2), a partir de los cuales se obtuvieron tres nuevos fragmentos de 297pb, 567pb y 463pb respectivamente.

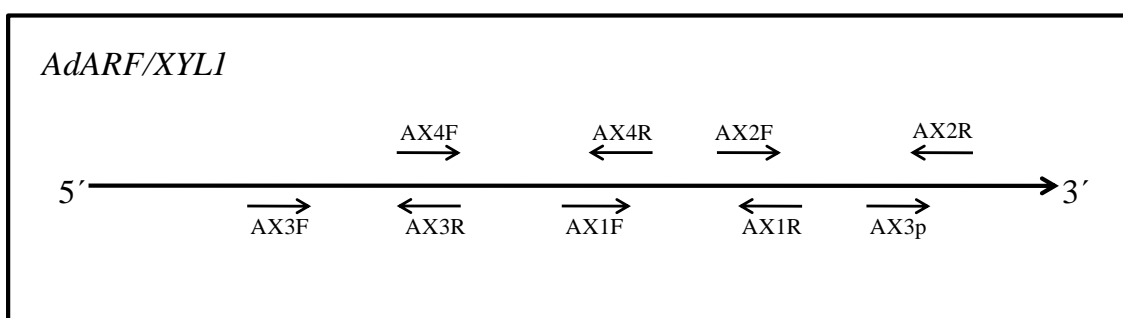


Figura 2.2 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen *AdARF/XYL1*.

Las flechas indican la dirección de los ‘primers’.

Los programas de PCR y las secuencias de nucleótidos de los ‘primers’ se indican en las secciones 2.3.9 y 2.3.10. Todos los fragmentos se purificaron de los geles de agarosa, se clonaron en el vector pGEM-T y se secuenciaron. El extremo 3' se obtuvo mediante la técnica RACE-PCR con el kit comercial RACE 3' (Invitrogen Corporation, EE.UU.), utilizando como el ‘primer’ GSP - AX3p. El producto amplificado mediante una *Taq* polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen Corporation, EE.UU.), se purificó de gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T y se secuenció.

Se alinearon todos los fragmentos por solapamiento en el programa VectorNTI y se obtuvo una secuencia de 1928 pb cual fue denominada *AdARF/XYL1*.

2.2.4.3. Obtención de la secuencia parcial del gen *AdARF1*

A fin de obtener un fragmento de secuencia codificante de una α -Ara de kiwi, de la cual no se encontraron ejemplos registrados en las bases de datos del GenBank, se alinearon las secuencias codificantes de esta enzima en otros frutos. Se utilizaron los clones: *PpARF1* de durazno (*Prunus persica*, número de acceso GenBank: DQ486870), *AFase1* de manzana (*Malus x domestica*, AY309436) y *PpARF1* de pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*, AB073311). Se eligió la zona de alineamiento más conservada y se diseñaron dos ‘primers’, ARF1F y ARF1R (Figura 2.3).

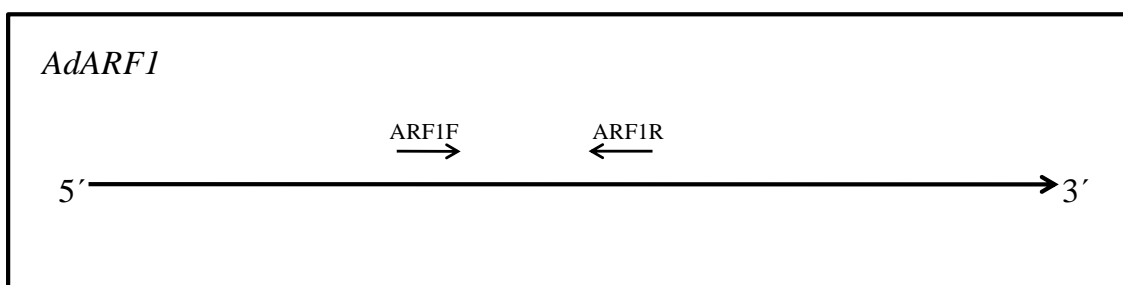


Figura 2.3 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen *AdARF1*.

Las flechas indican la dirección de los ‘primers’.

El producto de amplificación se purificó del gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T y se secuenció. Se analizó la secuencia obtenida de 284 pb en el programa BLASTN, que demostró la homología con α -Ara de otros frutos. La secuencia se denominó *AdARF1*.

2.2.4.4. Obtención de la secuencia parcial del gen *AdPL1*

A fin de obtener una secuencia codificante de una PL en kiwi, de la cual no se encontraron registros en las bases de datos del GenBank, se alinearon las secuencias codificantes a esta enzima en otros frutos, utilizando los clones: *PpPL1* de durazno (*Prunus persica*, número de acceso GenBank: AB264095), *MdPL1* de manzana (*Malus x domestica*, AY376878), *Pm65* de mume o ciruela china (*Prunus mume*, AB218786) y

PcPLI de frutilla chilena (*Fragaria chiloensis*, EF441273), y se diseñaron dos ‘primers’ PLF1 y PLR1 (Figura 2.4).

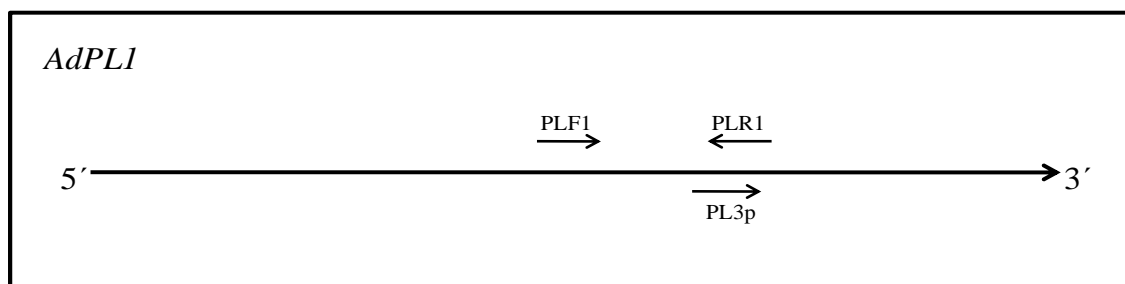


Figura 2.4 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen *AdPLI*.

Las flechas indican la dirección de los ‘primers’.

El producto de amplificación se purificó del gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T y se secuenció. Los programas de PCR y las secuencias de nucleótidos de los ‘primers’ están indicados en las secciones 2.3.9 y 2.3.10. El extremo 3’ se obtuvo mediante la técnica RACE-PCR con el kit comercial RACE 3’ (Invitrogen Corporation, EE.UU.), utilizando como el ‘primer’ GSP - PL3p. El producto amplificado se purificó del gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T y se secuenció. Alineando los dos fragmentos juntos por solapamiento mediante el programa Vector NTI se obtuvo un fragmento de 710 pb cual incluyó el extremo 3’. Mediante el programa BLASTN se verificó que el fragmento obtenido fuera el de interés y se lo denominó *AdPLI*.

2.2.4.5. Obtención de la secuencia parcial del gen *Actina*

A fin de obtener una secuencia del gen constitutivo de *Actina* de kiwi, del cual no se encontraron datos en las bases de datos del GenBank al inicio de esta Tesis, se utilizaron dos ‘primers’ diseñados a partir de una secuencia de actina de *Prunus persica*: Act1F y Act1R (Figura 2.5).

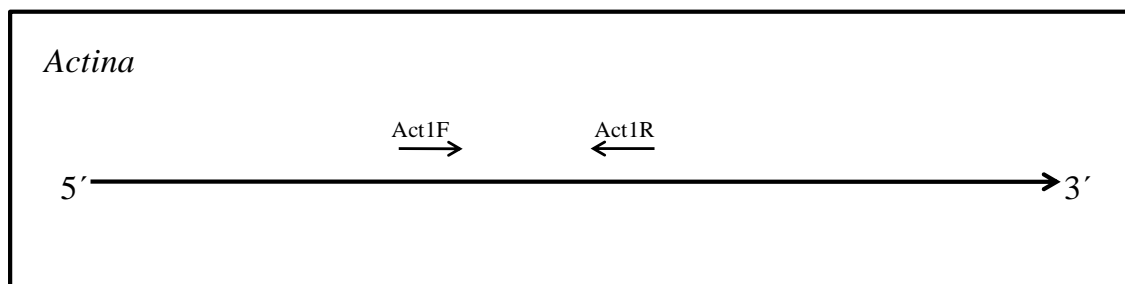


Figura 2.5 Representación esquemática de los ‘primers’ utilizados para la obtención de la secuencia parcial del gen de *Actina*.

Las flechas indican la dirección de los ‘primers’.

Así, mediante la técnica RT-PCR se amplificó un fragmento, el cual fue purificado, clonado en el vector pGEM-T y secuenciado. El programa de PCR y las secuencias de nucleótidos de los ‘primers’ se indican en las secciones 2.3.9 y 2.3.10. La secuencia de nucleótidos de 245 pb se analizó en el programa BLASTN y demostró su homología con las secuencias de actina de plantas. A partir de esta secuencia se diseñó otro par de ‘primers’ (Cuadro 2.2, sección 2.3.10) específicos del kiwi para su uso en la estimación de transcritos mediante la técnica RT-PCR semicuantitativa.

2.2.4.6. Secuencias de los genes *AdEXP1* y *AdEXP2*

Las secuencias de los genes *AdEXP1* (*Actinidia deliciosa*, número de acceso GenBank AY390358) y *AdEXP2* (*Actinidia deliciosa*, DQ919540) codificantes de la EXPA subgrupo A y subgrupo B, respectivamente, se tomaron de las bases de datos del GenBank, y a partir de estas secuencias se diseñaron los primers específicos (cuadro 2.3, sección 2.3.10).

2.2.5. Experimento 5: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante el crecimiento y desarrollo de los frutos

Para evaluar la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante la ontogenia de kiwis ‘Bruno’, se realizaron muestreos en dos temporadas consecutivas durante los años 2007-2008 y 2008-2009, en distintas fases del crecimiento y desarrollo del kiwi.

Desde el momento de la antesis, los frutos se cosecharon aleatoriamente los días: 5, 17 y 31 (Fase I), 59 y 82 (Fase II), 90, 111 y 133 (Fase III) y 154, 175 y 196 (Fase IV, Estadio 1).

En cada muestreo se recolectaron 10 frutos para la determinación de peso fresco, longitud y diámetro (ver detalle en la sección 2.3.1). Luego, de los mismos frutos, se realizó la toma de muestras de mesocarpo y columela (para los días 5 y 17 en el fruto todavía no se puede diferenciar la columela del mesocarpo, por eso se muestreo el fruto entero) para futuras extracciones de ARNm (ver la sección 2.3.3.) a fin de cuantificar los transcritos de los genes de interés mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Las condiciones y los programas de PCR se describen en la sección 2.3.9. Las secuencias de nucleótidos de los ‘primers’ utilizados para cada gen se indican en la sección 2.3.10. Esta metodología de evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* además del Experimento 5 se utilizó en los Experimentos 6, 7 y 8.

2.2.6. Experimento 6: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en frutos durante el período de postcosecha y su vinculación con los niveles de firmeza y de producción de etileno

Para evaluar la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante el período de postcosecha de kiwis “Bruno”, mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa, se realizaron muestreos de frutos cosechados al momento de su madurez fisiológica (Estadio 2) y posteriormente almacenados a 20 ± 2 °C. Se utilizaron 12 frutos por muestreo para la medición de producción del etileno y determinación de firmeza (sección 2.3.2) los días 1, 5, 9, 13, 16, 20 y 23 cuando los frutos alcanzaron la sobremadurez.

Además, los días 1, 9, 16, 20 y 23 se tomaron muestras de mesocarpo y columela de los mismos frutos utilizados para las mediciones físicas (ver sección 2.3.3) para utilizarlos en las extracciones de ARNm a fin de cuantificar los transcritos de los genes de interés.

2.2.7. Experimento 7: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en frutos tratados con etileno y con 1-MCP, y su vinculación con los niveles de firmeza

Para evaluar la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en frutos tratados con 1-MCP y etileno se utilizaron kiwis “Bruno”. Los frutos con firmeza de ~ 32 N, libres de deterioro y defectos se separaron al azar en unidades experimentales de 80 frutos.

La aplicación de 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ y de etileno 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ se realizó según se detalla en el experimento 1 (ver sección 2.2.1). Los frutos control se mantuvieron en las mismas condiciones que los frutos tratados, pero sin aplicación de 1-MCP o etileno. Se realizaron los muestreos a las 3, 6, 24 y 48 h después de aplicar los tratamientos. Por cada muestreo se utilizaron 12 frutos para determinación de firmeza y toma de muestra de mesocarpo para las extracciones de ARNm.

2.2.8. Experimento 8: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en órganos florales y tejidos vegetativos

Para evaluar si la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* es específica de los frutos o no, se realizaron muestreos en otros tejidos vegetativos y florales. En el momento de plena floración del cultivar Bruno se recolectaron las flores femeninas y se muestrearon como esta descrito en la sección 2.3.3.

Además de los tejidos florales, a partir de las plántulas del cultivar Bruno se muestrearon raíces y hojas primarias (ver sección 2.3.3).

2.3. Métodos

2.3.1. Medición de los índices físicos del fruto

Para la medición del tamaño de los frutos se empleó un calibre manual. Se midió el largo de los frutos y la determinación del diámetro se realizó promediando el diámetro menor y el mayor. El peso de los frutos se determinó con una balanza Scout (error: 0,01 g).

2.3.2. Medición de producción de etileno y determinación de firmeza

La medición de la producción de etileno se efectuó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II, utilizando una columna de acero inoxidable Porapak N (3,2 mm x 2 m; 80/100 mesh) y un detector de ionización de llama. Como gas transportador se utilizó N₂ con un flujo de 22 mL min⁻¹. Las temperaturas del inyector, de la columna y del detector fueron de 110 °C, 90 °C y 250 °C respectivamente. Cada fruto fue encerrado en un frasco de vidrio de 1,5 L, el que fue cerrado y sellado herméticamente con un septo de silicona. Transcurrida 1 h fue extraído 1 mL del gas contenido en el frasco para su inyección y medición en el cromatógrafo según metodología descrita en Boquete et al. (2004).

La firmeza de los frutos se determinó utilizando un Instron Universal Testing Machine (modelo 3342, Canton, MA, EE.UU.). Cada fruto se ubicó sobre una placa de acero. Con previa remoción de una sección del epicarpo, en dos lugares opuestos de fruto, se midió la fuerza requerida para penetrar la pulpa del fruto hasta 10 mm de profundidad, introduciendo una punta de 7,9 mm de diámetro en su zona ecuatorial. La velocidad de penetración fue de 50 mm min⁻¹ (Boquete et al., 2004). De esta manera se obtuvieron dos mediciones de firmeza por fruto, a fin de lograr una cuantificación más representativa.

2.3.3. Muestreos de material vegetal

Los muestreos de material vegetal para posteriores extracciones de ARNm se realizaron con bisturí y guantes estériles. Para la toma de muestra de un fruto se

eliminaron primero las vellosidades mediante una suave frotación con un paño de papel. Luego se retiró un fragmento de epicarpo y se diseccionó el fruto en cubos de mesocarpo y columela por separado. Los fragmentos de tejidos se colocaron con ayuda de una pinza estéril a un tubo de tipo Eppendorf, se rotuló e inmediatamente se congeló en N líquido. Posteriormente los tubos con muestras se guardaron en congelador a -20°C hasta su utilización.

Las muestras de raíces y hojas jóvenes se obtuvieron a partir de plántulas crecidas en un invernáculo. En el momento cuando las plántulas alcanzaron medir aproximadamente 5 cm de altura, se retiraron cuidadosamente de la vernaculita. Las raíces se lavaron con agua estéril y se secaron con un paño de papel. Luego se colocaron en los tubos de tipo Eppendorf las raíces por un lado, y las hojas primarias por el otro, se congelaron inmediatamente en N líquido y se guardaron en el congelador a -20°C hasta su utilización.

Las muestras de órganos florales se tomaron de las flores femeninas en el momento de plena floración. Las flores fueron separadas en sépalos, pétalos, estambres, estilos y ovarios. Los tejidos florales se guardaron por separado en los tubos de tipo Eppendorf, se congelaron en N líquido y el mismo día se procedió a la extracción de ARNm (ver sección 2.3.4) debido a su rápida oxidación.

2.3.4. Extracción de ARNm

Dada la dificultad que existe para aislar ARN de los tejidos del fruto kiwi por su alto contenido de azúcares y polifenoles, la extracción de ARNm se realizó mediante la técnica de las partículas magnéticas de estreptavidina y oligo-dT biotina (*mRNA Isolation Kit*), suministrado por Roche Molecular Biochemicals (GmbH, Mannheim, Alemania). Se siguieron las especificaciones del fabricante con algunas modificaciones.

A fin de poder comparar entre muestras de frutos, órganos florales, hojas y raíces, se utilizó la misma técnica de extracción de ARNm para todos estos órganos.

Durante la extracción se trabajó con materiales estériles, libres de ribonucleasas, en frío. Se utilizó una muestra compuesta, obtenida por la unión de tres repeticiones para cada tejido.

El protocolo seguido se detalla a continuación.

Se colocaron 300-600 mg de muestra en un mortero de porcelana previamente enfriado. Se añadió el N líquido y se redujo el tejido a polvo fino con ayuda de un pilón, adicionando más N líquido si era necesario, para evitar descongelamientos. Luego se agregó la solución reguladora de lisis (solución reguladora Tris 0,1 M, LiCl 0,3M, EDTA 10 mM, dodecilsulfato de litio 1%, DTT 5mM, pH 7.5), en una proporción de 150 μ L de solución reguladora por cada 100 mg de tejido, malaxando hasta obtener una mezcla bien homogénea. Finalmente, el homogenato se transfirió a un tubo de tipo Eppendorf de 2 μ L estéril.

La muestra se centrifugó durante 30 s a 10.000 rpm a temperatura ambiente en una microcentrífuga. Se transfirió el sobrenadante con cuidado a otro tubo limpio y se guardó en hielo, mientras que el precipitado se descartó.

Se agregó 1,5 μ L de oligo dT-biotina marcada, mezclando suavemente, y se dejaron los tubos en hielo mientras se preparaban las partículas magnéticas.

Para la preparación de éstas, se dispusieron alícuotas de 150 μ L de la solución de las mismas en los tubos de tipo Eppendorf de 2 μ L, que se colocaron en el separador magnético, descartándose el líquido de conservación. Las partículas se lavaron una vez con la solución reguladora de lisis, y se volvieron a separar magnéticamente, desechándose del agua del lavado por completo.

A los tubos con las partículas se les añadieron los extractos con oligo dT-biotina, mezclándose suavemente hasta la dispersión total. Los tubos se mantuvieron en el hielo durante 5 min, para permitir la unión de ARNm marcado con las partículas.

Luego, los tubos se colocaron en el separador magnético y se dejaron durante 3-5 min a fin de aislar las partículas unidas a ARNm, descartándose la solución sobrenadante.

Posteriormente se realizaron tres lavados con la solución reguladora de lavado (solución reguladora Tris 10 mM, LiCl 0,2 M, EDTA 1 mM, pH 7,5), separando las partículas y descartando el líquido.

Después del último lavado, la solución reguladora se retiró por completo y se añadieron a los tubos 25 μ L de agua libre de ARNsas (Fermentas), resuspendiendo muy suavemente. La suspensión se incubó en baño térmico a 65 °C durante 2 min. Este paso permite la disociación del ARNm de las partículas magnéticas. Utilizando el separador

magnético, se recuperaron las partículas y se retiró el agua que contenía el ARNm al otro tubo. Se agregó 1 µl de inhibidor de RNAsas (Fermentas) y se cuantificó la concentración de mRNA con fluorómetro Qubit (Invitrogen Corporation, EE.UU.).

2.3.5. Cuantificación de ARNm y ADN

La concentración de ARNm o de ADN se determinó por el método de fluorescencia, utilizando el fluorómetro Qubit (Invitrogen Corporation, EE.UU.), siguiendo las instrucciones e indicaciones del fabricante. Se utilizó un colorante específico, dependiendo del tipo de molécula (ADN o ARN), y el QUBIT Quantitation Starter Kit.

Cada colorante es específico para un tipo de molécula: ADN o ARN. Los colorantes tienen fluorescencia muy baja hasta que se unen a las moléculas de ácidos nucleicos. Tras la unión, se vuelven intensamente fluorescentes. La diferencia en la fluorescencia entre el colorante unido y sin unir es de varios órdenes de magnitud. El nivel de señal de fluorescencia de esta mezcla es directamente proporcional a la concentración de ácido nucleico en la solución. El fluorómetro Qubit puede percibir esta señal de fluorescencia y convertirla en una medición de concentración de ácido nucleico, utilizando los estándares de concentración conocida.

2.3.6. Síntesis de ADNc

En este trabajo de Tesis la síntesis de ADN complementario (ADNc) se utilizó para dos propósitos. Por un lado, para las mediciones de la expresión de los genes mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa y, por otro lado, para la clonación de los fragmentos de genes por la técnica de RT-PCR.

Para la síntesis de ADNc se preparó una mezcla de 50 ng de ARNm, 1 µL de oligodT (0,5 mg/mL, Fermentas) y agua libre de ARNsas en cantidad suficiente para alcanzar un volumen de 11 µL. El procedimiento se inició con la incubación de la mezcla durante 5 min a 70 °C y luego durante 2 min a 4 °C. Luego se agregaron en orden los siguientes componentes: 4 µL de solución reguladora de reacción M-MuLV 5x (Tris-HCl 250 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 20 mM, DTT 50 mM, Fermentas), 2 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de inhibidor de ARNsas y 1,5 µL de agua libre de ARNsas. Se

incubó durante 5 min a 37 °C. Luego se agregó 1 µL de la enzima transcriptasa reversa a la mezcla y se incubó durante 1 h a 42 °C. La reacción finalizó calentando la muestra durante 10 min a 70 °C, con posterior enfriamiento a 4 °C.

2.3.7. RT-PCR

La técnica de reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR) consiste en la obtención de ADNc a partir de ARN mediante la acción de una transcriptasa reversa y luego la amplificación del fragmento de interés mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR). De este modo, RT-PCR en biología molecular puede ser usada para determinar la presencia o ausencia de un transcrito, para estimar los niveles de expresión de un gen determinado e, incluso, para clonar DNA sin la necesidad de una librería de ADNc. Aunque padece de una falta de precisión a la hora de calcular los niveles exactos de expresión de un gen, debido principalmente a la naturaleza exponencial de la amplificación, es muy apropiada para comparar las cantidades relativas de un ARNm específico en diferentes tejidos, o en un mismo tejido en distintas condiciones fisiológicas. Para llegar a este objetivo se necesita una cuidadosa puesta a punto de la técnica, que comienza con el diseño de los ‘primers’ y finaliza con la determinación del programa más adecuado en el equipo de PCR.

Todas las reacciones de RT-PCR realizados en este trabajo se llevaron a cabo utilizando la transcriptasa reversa *RevertAidTM M-MuLV Reverse* suministrada por Fermentas Inc. (empresa integrada a Thermo Fisher Scientific, Inc, USA). Para su utilización se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.3.8. Reacciones semicuantitativas de RT-PCR

La técnica de RT-PCR semicuantitativa se utilizó para la medición de los transcritos de ARNm y la detección de cambios en sus niveles de transcripción bajo diferentes condiciones experimentales, utilizando siempre como referencia un gen constitutivo.

Los ARNm fueron extraídos de diferentes tejidos reproductivos, vegetativos y frutales según se detalla en la sección 2.3.4.

La síntesis de ADNc con el uso de una transcriptasa reversa se realizó como esta descrito en la sección 2.3.6.

Los ‘primers’ específicos fueron diseñados a partir de secuencias conocidas disponibles en el GenBank o a partir de las secuencias obtenidas en este trabajo de Tesis, mediante el programa *Oligo PerfectTM Designer* (Invitrogen Corporation, EE.UU.). Las secuencias de nucleótidos de los ‘primers’ utilizados se pueden encontrar en el Cuadro 2.3, sección 2.3.10.

Se pusieron a punto los programas de amplificación para cada par de ‘primers’ para el fin de obtener el número de ciclos, el tiempo y la temperatura apropiados de todos los pasos del programa (sección 2.3.9). Los reactivos y soluciones utilizados para la PCR fueron siguientes: solución reguladora de reacción con KCl y MgCl₂ 10x (Tris HCl 100 mM, KCl 500 mM, Nonidet P40 0,8%, MCl₂ 15 mM; Fermentas), dNTPs 10 mM (dCTP, dATP, dGTP y dTTP; Fermentas), ‘primers’ 10 mM, ADNc molde, *Taq* polimerasa (Fermentas) y agua miliQ estéril hasta alcanzar un volumen final de 25 µL.

2.3.9. Condiciones de PCR para los genes *KWACS1*, *KWACS2*, *KWACO1*, *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1*, *AdEXP2* y *Actina*

Para la medición de los transcriptos de ARN de los diferentes genes, mediante la técnica de PCR, se utilizaron los siguientes programas en el termociclador, donde se repitió la desnaturalización inicial de 4 min a 95 °C como también la extensión final de 7 min a 72 °C. Las variaciones del programa para todos los genes se detallan en el Cuadro 2.1.

Para evitar la amplificación de productos inespecíficos y la extensión de los ‘primers’ durante el proceso de desnaturalización inicial se procedió al uso de la práctica denominada ‘hot start’. Después de terminar la preparación de la mezcla de la PCR, el termociclador se precalentó y equilibró a la temperatura de 95 °C, y recién entonces se colocaron los tubos en el aparato.

Nombre del gen	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	Nº de ciclos
<i>KWACSI</i>	45 " 95°C	1 ' 56°C	1 ' 72°C	35
<i>KWACS2</i>	45 " 95°C	1 ' 52°C	1 ' 72°C	35
<i>KWACO1</i>	45 " 95°C	1 ' 52°C	1 ' 72°C	25
<i>AdGAL1</i>	50 " 95°C	1 ' 56°C	1 ' 72°C	37
<i>AdARF/XYL1</i>	45 " 95°C	1 ' 52°C	1 ' 72°C	35
<i>AdARF1</i>	45 " 95°C	1 ' 52°C	1 ' 72°C	25
<i>AdPL1</i>	50 " 95°C	1 ' 10 " 52°C	1 ' 15 " 72°C	37
<i>AdEXP1</i>	45 " 95°C	45 " 51°C	1 ' 72°C	31
<i>AdEXP2</i>	45 " 95°C	45 " 51°C	1 ' 72°C	32
<i>Actina</i>	45 " 95°C	45 " 56°C	1 ' 72°C	25

Cuadro 2.1 Variaciones del programa de la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR para los genes *KWACSI*, *KWACS2*, *KWACO1*, *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1*, *AdEXP2* y *Actina*.

2.3.10. Secuencias de ‘primers’

Las secuencias de los ‘primers’ utilizados en este trabajo de Tesis fueron sintetizadas por Tecnolab S.A. (Buenos Aires, Argentina). La descripción de los ‘primers’ utilizados para RT-PCR, con el detalle de su utilidad se especifica en el Cuadro 2.2.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Utilidad
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación
Sp6	CGATTAGGTGACACTATAG	Secuenciación
Oligo(dT) ₁₈	d(TTTTTTTTTTTTTTTTTT)	Retrotranscripción, síntesis ADNc
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT(T...T) ₁₆	3'RACE
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACG(G...G) ₁₆	5'RACE
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	5'RACE, 3'RACE
BGALF1	GAGGAACRAATTTTGGCCGA	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i>
BGALR1	GGAAGAATGCTGATRGACCA	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i>
BGALF2	TGGTCCATCAGCATTCTTCC	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i>
BGALR2	CCATATCTGACCTTTTCCCA	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i>
BGALF3	GGAATGGMCAATGAGCCTTCT	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i>
BGALR3	TCGGCCAAAATTYGTTCCTC	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i>
BGALGSP2	TCCCCCAAAGTTCATTACAGC	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i> , 5'RACE
BGALGSP3	AGAAGGCTCATGTCCATTC	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i> , 5'RACE
BGAL3p	TGGGAAAAGGTCAGATATGGAT	Obtención ADNc <i>AdGAL1</i> , 3'RACE
AX1F	GGTGACAGATGTTTATTGC	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX1R	TCCATGGWTCCAGTGTTTT	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX2F	CTAAAAGCCACCGCAAATC	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX2R	AATTCTTCGGATCCCAAACC	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX3F	GATGAAGCAAGGGCAATGTAC	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX3R	AAGGAAYGGCCACAATCCA	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX4F	TGGATTGTGGGCCRTTCCTT	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX4R	GCCTCAGCAGCACCAATAG	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i>
AX3p	TCAAGCACCTCAGCGTTGTGG	Obtención ADNc <i>AdARF/XYL1</i> , 3'RACE
ARF1F	TTCGAGGAGATTAATCACGC	Obtención ADNc <i>AdARF1</i>
ARF1R	CTTTTCAATATTCATGCCCC	Obtención ADNc <i>AdARF1</i>
PLF1	ATACACGATTGCAAGCAAGG	Obtención ADNc <i>AdPL1</i>
PLR1	CCATGCCTACATCTTGGCAT	Obtención ADNc <i>AdPL1</i>
PLF2	GAATGCCAAGATGTAGGCATGG	Obtención ADNc <i>AdPL1</i> , 3'RACE
Act1F	TCCTTCGTCTTGACCTTGC	Obtención ADNc <i>Actina</i>
Act1R	ACGGAATCTCTCAGCTCCAA	Obtención ADNc <i>Actina</i>

Cuadro 2.2 'Primers' utilizados para RT-PCR, con el detalle de su utilidad específica.

Las degeneraciones de algunos 'primers' se indican a continuación: R=A/G, M=A/C, W=A/T, Y=C/T.

La descripción de los ‘primers’ utilizados para la medición de transcritos de ARNm de los genes *KWACSI*, *KWACS2*, *KWACO1*, *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1*, *AdEXP2* y *Actina* se indica en el Cuadro 2.3.

Nombre del gen	Primer directo 5'→3'	Primer reverso 5'→3'	Tamaño del fragmento (pb)
<i>KWACSI</i>	CACCAATGACAAAAACATCCA	TTTACGAGCACACGAAGTCA	192
<i>KWACS2</i>	ATTTACGCTGCCACGGTCT	GAAGCCCAAGTCCTTTGAGA	226
<i>KWACO1</i>	AGAGGCTGTTTCAGTCCGAAA	TCTCTAGCCCCAGGTTCTCA	197
<i>AdGAL1</i>	GAGGAACRAATTTTGCCGA	GGAAGAATGCTGATRGACCA	328
<i>AdARF/XYL1</i>	GAAGTCCATAGCCGATGTT	GTAGCCTCTTGCTGGGTCTG	137
<i>AdARF1</i>	GGGCTGAGCTTGTAAAGCAAC	CTACCGGCACCTTGGCTAT	187
<i>AdPL1</i>	ATACACGATTGCAAGCAAGG	CCATGCCTACATCTTGGCAT	338
<i>AdEXP1</i>	TCGTTGGGGAATGTGAAA	TCGAAGAGCTGCGGGCTA	138
<i>AdEXP2</i>	TCATTCCAAGGCCCCATT	AAGCACCTAAAACCAAAA	198
<i>Actina</i>	TGGCCGTGATCTAACAGATG	CTGAGGAGCTGCTCTTTGCT	164

Cuadro 2.3 ‘Primers’ utilizados para la medición de transcritos de ARNm de los genes *KWACSI*, *KWACS2*, *KWACO1*, *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1*, *AdEXP2* y *Actina*.

2.3.11. Amplificación rápida de los extremos 5' de ADNc (RACE 5')

El procedimiento conocido como ‘Rapid Amplification of cDNA Ends’ (RACE) permite la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos localizadas entre un sitio específico interno y secuencias desconocidas en los extremos 3' o 5' a partir de ARNm.

En este trabajo, la técnica RACE 5', que permite el aislamiento y la caracterización del extremo 5', se realizó utilizando el kit comercial *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0* (Invitrogen Corporation, EE.UU.).

La técnica consiste en realizar primero en la síntesis de ADNc a partir del ARNm poliadenilado utilizando el ‘Gene-Specific Primer’ (GSP1) específico de la secuencia de interés y la enzima *SuperScriptTM II RT*, derivada de M-MLV RT con actividad reducida de RNase H (Figura 2.6). Luego el ARNm se degrada mediante el tratamiento con *RNase Mix*.

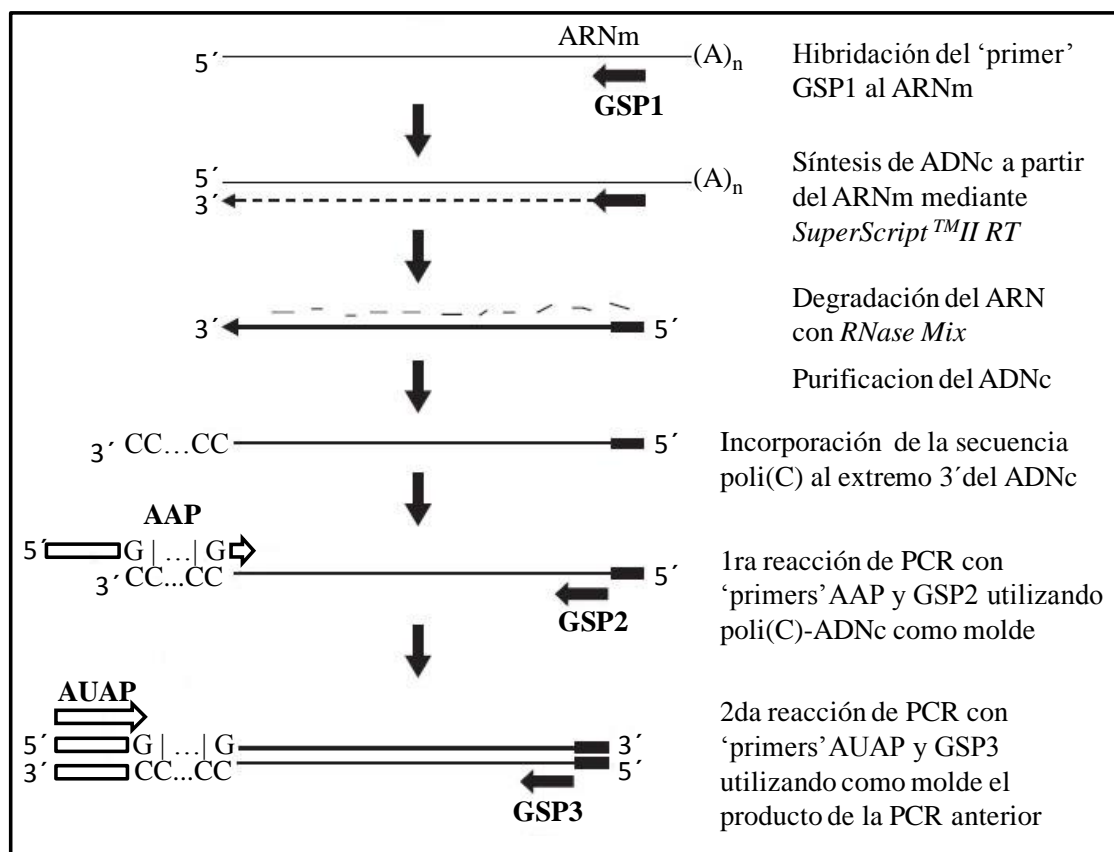


Figura 2.6 Representación esquemática de los pasos de la técnica RACE 5'.

El ADNc se purifica en la columna S.N.A.P.TM (Invitrogen Corporation, EE.UU.) separándolo de los dNTPs y restos de 'primer' GSP1 no incorporados en la síntesis. En el paso siguiente, la enzima *Terminal deoxynucleotidyl transferase* (*TdT*) y desoxirribonucleótidos de citosina (dCTP) se utilizan para agregar la secuencia poli(C) al extremo 3' del ADNc - proceso denominado 'TdT tailing'. Luego el poli(C)-ADNc sirve de molde en una reacción de PCR que utiliza *Taq* polimerasa y los 'primers' GSP2 y 'Abridge Anchor Primer' (AAP). Este último contiene una secuencia de poli(G), que se va a hibridar a la secuencia poli(C) del ADNc, y la secuencia adaptadora. Luego se realiza la segunda reacción de PCR utilizando como molde el producto de la PCR anterior y los 'primers' GSP3 y 'Abridge Iniversal Amplification Primer' (AUAP). La secuencia del 'primer' AUAP es complementaria a la secuencia adaptadora que se encuentra en el extremo 5' de la secuencia de interés. El GSP3 se ubica río arriba del GSP2. Como resultado de la segunda reacción de PCR, se amplifica un fragmento del extremo 5', flanqueada en el extremo 5' por el 'primer' AUAP y en el extremo 3' con el 'primer' GSP3 (Figura 2.6).

A continuación se describe detalladamente el protocolo utilizado para realizar la técnica RACE 5':

La síntesis de ADNc se realizó en un tubo de PCR al cual se añadió 2,5 pmoles de 'primer' GSP1, 50-500 ng de ARNm, y agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) suficiente hasta alcanzar un volumen final de 15,5 µL. La mezcla se incubó 10 min a 70 °C y luego se mantuvo en hielo durante 1 min. Después de realizar una breve centrifugación se añadieron en este orden: solución reguladora de PCR 10x, MgCl₂ 25 mM, mezcla de dNTPs 10 mM, DTT 0,1 M, hasta un volumen final de 24 µL. El contenido del tubo se mezcló suavemente y se recolectó mediante una breve centrifugación. Luego, la solución se incubó 1 min a 42 °C. Se añadió 1 µL de *SuperScriptTM II RT*. Se mezcló suavemente y se incubó primero 50 min a 42 °C, luego 15 min a 70 °C, y después se colocó a 37 °C. Se añadió 1 µL de *RNase Mix*, se mezcló con cuidado y se incubó a 37 °C durante 30 min. Luego la mezcla se guardó en hielo.

La purificación de ADNc mediante la columna S.N.A.P.TM se realizó de la siguiente manera: a la muestra de ADNc se añadió 120 µL de la solución Nal 6 M previamente equilibrada a temperatura ambiente. Se transfirió la solución ADNc/Nal a la columna S.N.A.P.TM y se centrifugó 20 s a 13.000 x g. El tubo interno se colocó en un tubo limpio y se realizaron 4 lavados con la solución de lavado 1x frío y dos lavados con etanol 70 %, centrifugando 20 s a 13.000 x g y descartando el precipitado. El tubo se transfirió a otro tubo limpio, se agregó 50 µL de agua estéril precalentada a 65 °C y se centrifugó 20 s a 13.000 x g para la elución del ADNc.

Una vez purificado el ADNc se realizó la reacción de 'TdT tailing'. Para eso se preparó una mezcla de agua tratada con DEPC, solución reguladora 'tailing' 5x, dCTP 2 mM, ADNc purificado, con un volumen final de 24 µL. La mezcla se incubó 2-3 min a 94 °C y luego se colocó el tubo en hielo durante 1 min. Se añadió 1 µL de *TdT*, se mezcló suavemente, se incubó 10 min a 37 °C y luego 10 min a 65 °C para inactivar la *TdT*. Se recolectó el contenido del tubo mediante una breve centrifugación y se guardó en hielo.

Luego, se realizó la primera reacción de PCR utilizando el poli(C)-ADNc como molde. Para esto se agregó en un tubo de PCR: 31,5 µL de agua destilada, 5 µL de solución reguladora de PCR 10x (Tris-HCl 200 mM pH=8,4, KCl 500 mM), 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de mezcla de dNTPs 10 mM, 2 µL del 'primer' GSP2 10 µM, 2 µL

del ‘primer’ AAP 10 μ M, 5 μ L de ‘dC-tailed’ ADNc y 0,5 μ L de *Taq* ADN polimerasa. Se mezcló suavemente y se colocó en el termociclador previamente calentado a 94 °C para evitar la amplificación de productos inespecíficos.

La segunda reacción de PCR se realizó utilizando como molde una dilución del producto amplificado en la primera reacción de PCR. En un tubo de PCR se añadieron: 31,5 μ L de agua destilada, 5 μ L de solución reguladora de PCR 10x (Tris-HCl 200 mM pH=8,4, KCl 500 mM), 3 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ L de mezcla de dNTPs 10 mM, 2 μ L del ‘primer’ GSP3 10 μ M, 2 μ L del ‘primer’ AUAP 10 μ M, 5 μ L del producto de la primera PCR 1% y 0,5 μ L de *Taq* ADN polimerasa.

Las dos reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante una primera fase de desnaturalización de ADNc, durante 3 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos que contenían: una fase de desnaturalización de 30 s a 94 °C, una fase de hibridación de 45 s a 56 °C y una fase final de extensión de 1 min a 72 °C. Luego se analizaron 7 μ L del producto de la reacción de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Las secuencias de los ‘primers’ utilizados en la técnica RACE 5’ se encuentran en la sección 2.3.10, Cuadro 2.2.

2.3.12. Amplificación rápida de los extremos 3’ de ADNc (RACE 3’)

En este trabajo, para el aislamiento del extremo 3’ se aplicó la técnica RACE 3’ utilizando el kit comercial *3’ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version E* (Invitrogen Corporation, EE.UU.).

El procedimiento de RACE 3’ consta de varios pasos (Figura 2.7). En el primer paso se realiza una síntesis de ADNc a partir de ARNm utilizando la enzima *SuperScriptTM II RT* y un ‘oligo-dT Adapter Primer’ (AP). Este último está compuesto por una secuencia de poli(T) complementaria a la secuencia poli(A) del ARNm, y una secuencia adaptadora. Luego de sintetizar el ADNc, el ARNm se degrada mediante la enzima *RNase H*. Posteriormente, se amplifica el gen mediante la reacción de PCR utilizando el ‘primer’ GSP específico de la secuencia de interés y el AUAP complementario a la región 3’. De esta manera, la técnica RACE 3’ permite amplificar un fragmento de ADN cercano a la región 3’ de la secuencia de interés.

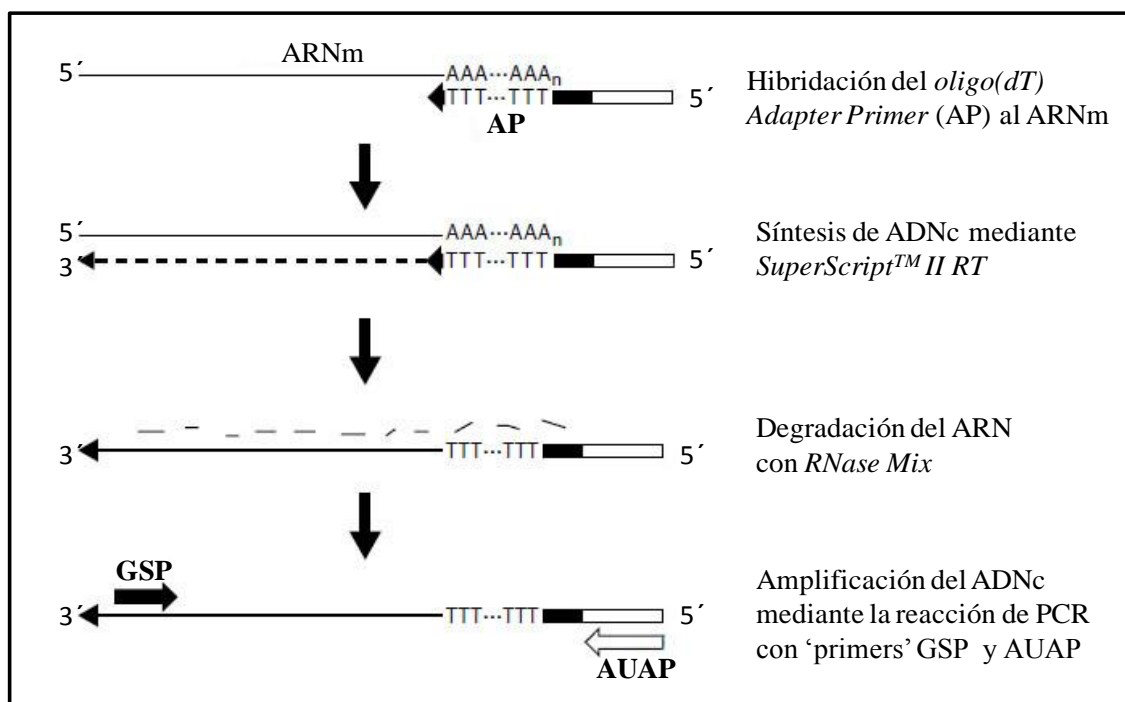


Figura 2.7 Representación esquemática de los pasos de la técnica RACE 3'.

El protocolo utilizado se detalla a continuación. En un tubo de PCR se agregó 50-200 ng de ARNm y agua tratada con DEPC para obtener un volumen final de 11 µL. Luego se añadió 1 µL de solución AP 10 µM, se mezcló suavemente y se recolectó mediante una breve centrifugación.

La mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min y luego se enfrió en hielo durante 1-2 min. Se recolectó el contenido del tubo mediante una breve centrifugación y se añadieron los siguientes componentes en este orden: 2 µL de solución reguladora de PCR 10x, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de la mezcla de dNTPs 10 mM, 2 µL de DTT 0,1 M. La mezcla se equilibró a 42 °C durante 2-5 min, se añadió 1 µL de la enzima *SuperScript™ II RT* y se incubó a 42 °C durante 50 min.

La reacción finalizó incubando la mezcla a 79 °C durante 15 min.

Luego, el tubo se colocó en hielo y, después de realizar una breve centrifugación, se añadió 1 µL de la enzima *RNase H*, se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 15 min. Por último, el tubo que contenía el ADNc sintetizado se guardó en hielo o se congeló a -20 °C.

En el siguiente paso el ADNc obtenido se utilizó como molde para la amplificación del fragmento de interés mediante la técnica de PCR. En un tubo de PCR

se añadió en este orden: 5 µL de solución reguladora de PCR 10x, 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de una mezcla de dNTPs 10 mM, 1 µL del ‘primer’ GSP 10 µM, el ‘primer’ AUAP µM, 36,5 µL de agua destilada estéril, 0,5 µL de *Taq* polimerasa 2-5 unidades por µL y 2 µL de ADNc. Se mezcló suavemente y se recolectó el contenido del tubo mediante una breve centrifugación.

Se incubó la reacción a 94 °C durante 3 min y luego se realizaron 35 ciclos de PCR, utilizando el protocolo específico para la *Taq* polimerasa. Luego se analizaron 6 µL del producto de la reacción de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa.

2.3.13. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las moléculas de ADN con un tamaño comprendido entre 100 pb y 50 Kb de longitud se pueden separar en geles de agarosa de diversa concentración. Este tipo de geles se someten a electroforesis horizontales en un campo eléctrico de dirección constante.

Se prepararon los geles en solución reguladora TAE (20 mL de TAE 50x: Tris, EdTA, ácido acético glacial, y la cantidad de agua destilada requerida para obtener 1 L de solución, pH 8,5) pesando la cantidad adecuada de agarosa (extra pura, Invitrogen Corporation, EE.UU.) en función de la concentración 1,5% p/v del gel. Posteriormente se calentó la mezcla hasta ebullición y se vertió en el molde dejándose solidificar.

Tanto las muestras de ADN como el marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen Corporation EE.UU.) se mezclaron con la solución reguladora de carga 6x (azul de bromofenol 0,3 %, glicerol 30 %) y se adicionaron a los pocillos del gel. En la corrida electroforética se utilizó solución reguladora TAE 1x y un voltaje constante de 100 V.

2.3.14. Visualización de los productos de PCR

Para visualización de los productos de PCR se utilizó el reactivo *SybrGreen* (Invitrogen Corporation, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Así, luego de realizar la corrida electroforética, el gel de agarosa se tiñó con la solución de *SybrGreen* y solución reguladora TAE 1x durante 50-60 min. Al terminar el tiempo de

la incubación, el gel se colocó en el transiluminador para su exposición a luz UV, y se tomó una foto mediante una cámara fotográfica instalada en el equipo.

2.3.15. Extracción de ADN de geles de agarosa

En caso de requerir la extracción de ADN del gel de agarosa, la electroforesis se realizó en agarosa 1 % preparada en la solución reguladora TAE 1x. Se siguió el procedimiento que se describe a continuación.

Se identificó en el transiluminador la banda de interés en el gel de agarosa teñido con la solución de SybrGreen. Se recortó con bisturí el fragmento del gel de agarosa que contenían el ADN de interés y se procedió a la extracción del ADN de estos fragmentos utilizando el kit comercial de Extracción de ADN (*DNA Extraction Kit*, Fermentas).

El fragmento recortado se pesó, se colocó en un tubo de tipo Eppendorf limpio y se le agregó la solución de yoduro de sodio 6 M a razón de 3 volúmenes de dicha solución por un volumen del gel. Se incubó durante 8-10 min a 55 °C hasta disolver el gel.

Luego se agregó 5 µL de suspensión de polvo de sílica y se incubó durante 5 min a 55 °C, mezclando la muestra cada 2 min en un vortex. El tubo se centrifugó con el complejo polvo de sílica-ADN durante 5 s a 13.000 rpm para formar el precipitado y remover el sobrenadante.

Posteriormente se realizaron tres lavados con 500 µL de la solución reguladora de lavado (solución de Tris, NaCl, EDTA, Etanol y agua destilada) frío, resuspendiendo cada vez el precipitado completamente, luego centrifugando durante 5 s a 13.000 rpm y retirando el sobrenadante. Después de realizar el último lavado, se retiró por completo la solución reguladora y se dejó a secar la muestra al aire durante 10-15 min.

Finalmente a la muestra se agregó 5 µL de solución reguladora TE estéril (10 mM Tris HCl, pH 8, 1mM EDTA), se incubó durante 5 min a 55 °C y se centrifugó durante 30 s a 13.000 rpm. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante que contenía el ADN. Este último paso de elución de ADN del polvo de sílica se repitió dos veces. Luego se analizó el ADN extraído en una corrida electroforética y posterior visualización en el transiluminador por la exposición a luz UV.

2.3.16. Ligación de los productos purificados de PCR

La reacción de la unión del ADN purificado al vector plasmídico se realizó empleando el sistema *Vector pGEM-T Easy* (Promega) utilizando el vector pGEM-T. En cada caso se utilizó: 3 μ L del producto amplificado mediante PCR y purificado, 5 μ L de la solución reguladora de ligación 2x, 1 μ L de la enzima *T4 ADN ligasa* y 1 μ L del plásmido pGEM-T para obtener el volumen final de 10 μ L. La mezcla de ligación se incubó a 4 °C durante toda la noche.

2.3.17. Obtención de células competentes

El proceso de la introducción de ADN recombinante plasmídico en bacterias se denomina transformación. Para que la transformación sea efectiva es necesario tratar previamente a las bacterias para hacerlas competentes, es decir, más susceptibles a la entrada en ADN plasmídico. A continuación se describe el protocolo utilizado.

La técnica se realizó en el flujo laminar con los materiales estériles. Se tomaron células de *E. coli* pertenecientes a la cepa DH5 α , congeladas a -80 °C, y se sembraron por agotamiento en placas de Petri con medio LB-agar (Tryptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, agua destilada en csp 1 L) sin ampicilina. La placa se incubó durante 18 h en una estufa a 37 °C.

Una vez crecidas las colonias, se tomó una de ellas y se inoculó en 3 mL de medio LB – medio de Luria-Bertani (Tryptona 10g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g, agua destilada en csp 1 L) estéril. El inóculo permaneció en condiciones de crecimiento durante toda la noche, en agitación a 150 rpm a 37 °C. Posteriormente se tomó 1 mL del cultivo líquido para inocular 100 mL de medio LB estéril a 37 °C en agitación a 150 rpm hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, que se determinó midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm (para el blanco se utilizó medio LB sin cultivo).

Una vez alcanzada la fase logarítmica, se trabajó con el cultivo en frío, ya que la supervivencia de las células competentes está limitada por la temperatura. La suspensión celular se repartió en cuatro tubos tipo Falcon estériles de 100 mL cada uno y se retomaron las células por centrifugación a 3000 rpm durante 7 min a 4 °C.

Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 mL de la solución fría y estéril de CaCl₂ 0,1 M conteniendo glicerol 15 %. Se repartió todo el

volumen de la suspensión celular en 2 tubos, se dejó 40 min en hielo y después se centrifugó 10 min a 2100 rpm a 4 °C.

Se descartó el sobrenadante y el precipitado de cada tubo se resuspendió en 3 mL de solución fría y estéril de CaCl_2 0,1 M conteniendo glicerol 15 %. La suspensión celular se dividió en alícuotas de 200 μL , las cuales inmediatamente se guardaron a -80 °C hasta su utilización. Posteriormente se procedió a la transformación de estas células competentes.

2.3.18. Transformación de células competentes

La técnica de transformación utilizada en este trabajo de investigación fue el choque térmico. Se trabajó en el flujo laminar con los materiales estériles. El procedimiento empezó con la incubación de una alícuota de 200 μL de las bacterias competentes con 10 μL de mezcla de ligación (ADN recombinante) en hielo durante 1 h. Luego se realizó la incubación del tubo con la mezcla en baño térmico húmedo a 42 °C durante 1 min 45 s, lo que se denomina choque térmico. Esto induce a las bacterias a aceptar moléculas de ADN. Inmediatamente el tubo se volvió a colocar en hielo durante 5 min.

Se adicionaron 800 μL de medio LB y se incubó durante 1,5 h a 37 °C con agitación a 150 rpm.

Por otro lado, se preparó medio de cultivo sólido en placas de Petri conteniendo LB-agar con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. Se agregó a las placas 50 μL de X-Gal (Invitrogen Corporation, EE.UU.), solución preparada siguiendo las instrucciones del proveedor (10 mg mL^{-1} en formamida), utilizando las bolitas de siembra. Luego se dejaron secar las placas. El compuesto orgánico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) se utilizó como indicador de colonias que contenían el vector recombinante.

Posteriormente, la suspensión de células se centrifugó durante 30 s a 14000 rpm, se descartó 500 μL de sobrenadante, se resuspendió el precipitado en restantes 500 μL . Se tomaron 300 μL de suspensión para la siembra en las placas LB-agar con ampicilina y X-Gal.

Las placas se incubaron en una estufa a 37 °C durante 18 h. Se realizó un repique de las colonias blancas a fin de poder identificar la colonia necesaria fácilmente. Se seleccionaron colonias positivas (es decir, con el fragmento de interés) mediante la técnica de PCR de colonias. A partir de una de estas colonias se realizó la extracción de ADN plasmídico.

2.3.19. PCR sobre colonias

Tras la transformación de las bacterias con mezcla de ligación, se obtiene una placa con una cantidad determinada de colonias, unas positivas (Vector + inserto) y otras no (vector recircularizado). La amplificación por PCR sobre colonias potencialmente positivas nos permite confirmar que las colonias positivas contienen el fragmento de interés.

La amplificación sobre colonias de *E coli* se realizó de dos maneras. La primera consistió en añadir la colonia directamente sobre el tubo de PCR con todos los componentes, tras haber realizado una réplica en placa nueva para poder conservar e identificar la colonia.

Para la segunda opción fue necesario un paso previo en el cual la colonia fue depositada en un tubo de 0,6 mL con 5 µL de agua miliQ estéril. La suspensión se hirvió a 100 °C durante 5 min y se centrifugó a 13.000 rpm en centrífuga de mesa refrigerada, durante 3 min, utilizándose 1 µL del sobrenadante resultante como molde de la reacción de PCR. De esta forma se consiguen eliminar los restos celulares y LB-agar que puede interferir en la función de la *Taq* polimerasa.

2.3.20. Aislamiento de ADN plasmídico

La preparación de ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos en fase estacionaria de la cepa portadora. En el presente trabajo se realizaron minipreps (3-5 mL), utilizando el kit comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN Inc., CA, USA), siguiendo las instrucciones e indicaciones del manual del producto. Los principios de *QIAprep miniprep* están basados en una lisis alcalina de las células bacterianas con posterior absorción del ADN plasmídico por la membrana de sílica en la presencia de alto contenido de sales, con posteriores lavados y la elución del plásmido.

2.3.21. Secuenciación y análisis bioinformático

El análisis de las muestras de ADN plasmídico en las cuales se verificó la presencia de inserto se realizó en un secuenciador ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA), utilizando los primers T7 y Sp6.

Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se realizaron en los programas VectorNTI Suite 8 (Invitrogen Corporation, EE.UU.) y BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999).

La comparación de las secuencias de nucleótidos y de las secuencias deducidas de aminoácidos con la base de datos del GenBank se realizó utilizando el algoritmo NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1997).

El estudio de la secuencia completa de *AdGAL1* se realizó mediante varios programas descriptos a continuación:

Por medio del programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), se alineó y comparó la secuencia de aminoácidos deducida (Thompson et al., 1994).

El marco de lectura y la predicción de la proteína se realizaron usando el NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>).

Los dominios de la proteína se identificaron con el Simple Modular Architecture Research Tool (SMART; <http://smart.embl-heidelberg.de>) (Letunic et al., 2006).

Para predecir los péptidos señal y los sitios de clivaje se utilizó el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Nielsen et al., 1997), y la localización subcelular - usando el TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) (Emanuelsson et al., 2000).

El punto isoeléctrico teórico y el peso molecular del péptido maduro se calculó mediante el programa Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

2.3.22. Construcción del árbol filogenético

El análisis filogenético y el análisis de la evolución molecular de la secuencia completa de *AdGAL1* se realizó mediante el programa *MEGA version 4* (Tamura et al., 2007) utilizando el método Neighbor Joining. Se alinearon las secuencias de aminoácidos de 33 β -Gal mediante ClustalW, donde la secuencia del gen *LACA* de

Aspergillus niger ofició como ‘outgroup’. El soporte estadístico para los clados filogenéticos se calculó mediante un análisis con muestreos sucesivos, denominados ‘bootstrap’, de 1000 réplicas. Los números de acceso del GenBank de las secuencias están indicados en la sección 2.3.24, Cuadro 2.4.

2.3.23. Análisis estadístico

Los datos de la producción de etileno y de firmeza en los experimentos de esta Tesis se analizaron mediante análisis de varianza y prueba de Tukey utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2010). En todos los casos, el nivel de significación fue $p < 0,05$.

2.3.24. Números de acceso GenBank

Los números de acceso del GenBank de genes citados en este trabajo se detallan a continuación (Cuadro 2.4).

Denominación del gen	Nombre de especie	N° de acceso GenBank
<i>KWACS1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	AB005722
<i>KWACS2</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	AB005723
<i>KWACO1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	AB003514
<i>AdGAL1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	HQ108111
<i>AdARF/XYL1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	HQ108113
<i>AdAFR1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	HQ108110
<i>AdPL1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	HQ108112
<i>AdEXP1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	AY390358
<i>AdEXP2</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	DQ919540
<i>JP-GAL</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB046543
<i>PpGAL2</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB190363
<i>PpGAL3</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB190364
<i>PpGAL4</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB190365
<i>PpGAL5</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB190366
<i>PpGAL6</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB190367
<i>PpGAL7</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB190368
<i>PpGAL8</i>	<i>Pyrus pirifolia</i>	AB190369
<i>CsGAL1</i>	<i>Citrus sinensis</i>	AY029198
<i>AV-GAL</i>	<i>Persea americana</i>	AB061017
<i>PaGAL2</i>	<i>Persea americana</i>	AB252827
<i>PaGAL3</i>	<i>Persea americana</i>	AB252828
<i>PaGAL4</i>	<i>Persea americana</i>	AB252829
<i>SP26</i>	<i>Mangifera indica</i>	AF004812
<i>TBG1</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF023847

<i>TBG2</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF154420
<i>TBG3</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF154421
<i>TBG4</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF020390
<i>TBG5</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF154423
<i>TBG6</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF154424
<i>TBG7</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF154422
<i>pABG1</i>	<i>Malus x domestica</i>	L29451
<i>beta-gal1</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	AJ278703
<i>beta-gal2</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	AJ278704
<i>beta-gal3</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	AJ278701
<i>pBG(a)</i>	<i>Carica papaya</i>	FJ859031
<i>pBG(b)</i>	<i>Carica papaya</i>	FJ859030
<i>PcGAL1</i>	<i>Pyrus communis</i>	AB086423
<i>PcGAL2</i>	<i>Pyrus communis</i>	AB086424
<i>PpGAL1</i>	<i>Prunus persica</i>	EF568777
<i>PpGAL2</i>	<i>Prunus persica</i>	EF568776
<i>LACA</i>	<i>Aspergillus niger</i>	L06037
<i>PpARF/XYL</i>	<i>Prunus persica</i>	AB264280
<i>PpARF2</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB195230
<i>MdARF/XYL1</i>	<i>Malus x domestica</i>	GU937612
<i>Xyl1</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	AY486104
<i>ARF</i>	<i>Citrus unshiu</i>	AB364643
<i>PpARF1</i>	<i>Prunus persica</i>	DQ486870
<i>PsARF1</i>	<i>Prunus salicina</i>	DQ822467
<i>AFase1</i>	<i>Malus x domestica</i>	AY309436
<i>PPARF1</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB073311
<i>Ara1</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	EF635628
<i>PpPL1</i>	<i>Prunus persica</i>	AB264095
<i>MdPL1</i>	<i>Malus x domestica</i>	AY376878
<i>Pm65</i>	<i>Prunus mume</i>	AB218786
<i>PcPL1</i>	<i>Fragaria chiloensis</i>	EF441273

Cuadro 2.4 Los números de acceso del GenBank de genes citados en este trabajo.

En “negrita” están marcadas las secuencias que se obtuvieron en esta Tesis.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Experimento 1: Aplicación de 1-MCP o de etileno con posterior almacenamiento a 20 °C y evaluación de producción de etileno, firmeza y expresión de genes *KWACS1*, *KWACS2* y *KWACO1*

Para este experimento, los frutos de kiwi ‘Hayward’ de las regiones Mar del Sur y Baradero se cosecharon en el mismo estado de maduración. Sin embargo, su comportamiento en referencia al ablandamiento después de la cosecha fue diferente. Los controles de los frutos de Mar del Sur alcanzaron el pico de la producción de etileno en el día 24 (Figura 3.1, A), mientras que los frutos de Baradero mostraron el pico en el día 14 (Figura 3.2, A). Los frutos tratados con etileno provenientes de Mar del Sur adelantaron la aparición del climaterio de etileno autocatalítico 10 d respecto de los frutos control (Figura 3.1, A), mientras que los provenientes de Baradero mostraron un adelanto de 6 d (Figura 3.2, A). Además, en los frutos provenientes de Mar del Sur, el tratamiento con etileno aumentó la magnitud del pico de etileno 3-4 veces en comparación con los frutos control, mientras que los frutos provenientes de Baradero y tratados con etileno aumentaron 6 veces la magnitud del pico respecto de su control.

Tal cual lo esperado, el etileno aceleró el proceso normal de ablandamiento de los frutos de ambas regiones. Sin embargo, la tasa del ablandamiento de los frutos de Baradero (Figura 3.2, B) fue mayor que la de los frutos de Mar del Sur (Figura 3.1, B). Los frutos de Mar del Sur resultaron inadecuados para su consumo tras 21 d de almacenamiento luego de la aplicación de etileno, pero el mayor deterioro fue observado en los frutos de Baradero. Éstos últimos no fueron aptos para el consumo tan solo 8 d después de la aplicación de etileno. El tratamiento con el 1-MCP inhibió la producción del etileno durante el experimento en muestras de ambas regiones (Figura 3.1 y 3.2, A) y disminuyó la pérdida de firmeza significativamente (Figura 3.1 y 3.2, B). Mientras que los frutos de Baradero fueron considerados “listos para consumo” después

de 28 d, los frutos de Mar del Sur no llegaron a este estado durante la duración del experimento, manteniéndose en exceso firmes.

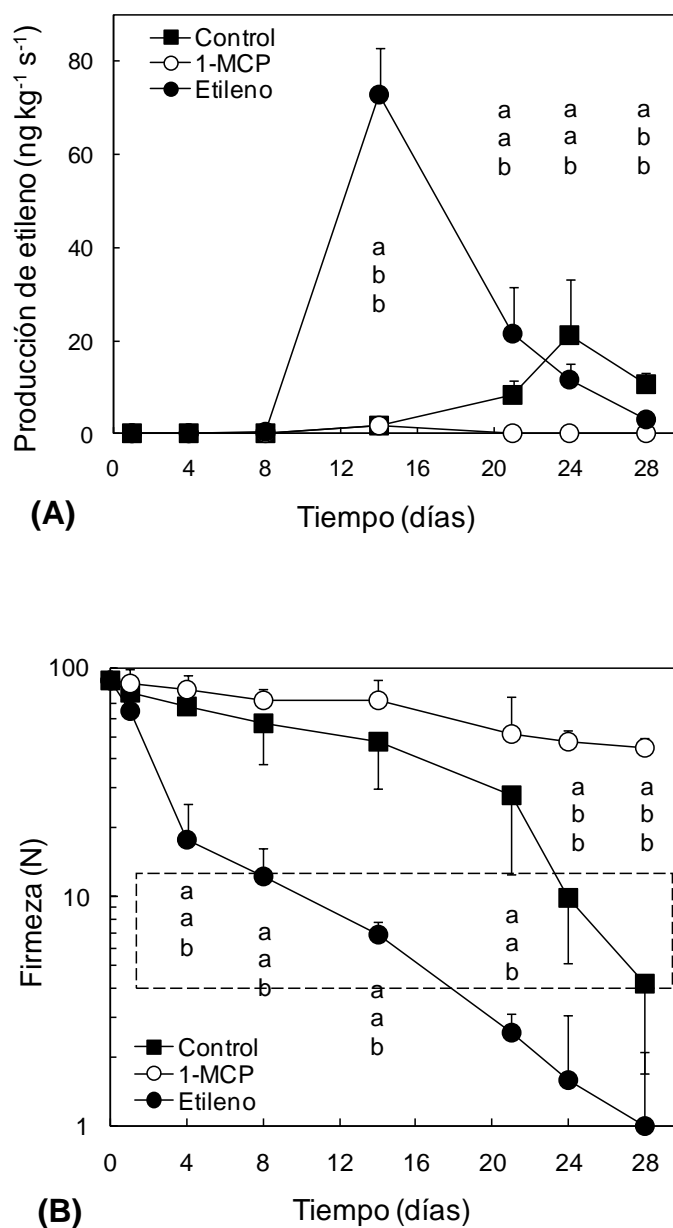


Figura 3.1 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis cosechados en Mar del Sur. Los kiwis se trataron con etileno 10 $\mu\text{L L}^{-1}$ o con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$. Se utilizaron frutos no tratados como controles. Después de la aplicación de los tratamientos los frutos se almacenaron a 20 ± 2 °C durante 28 d. Los valores representan las medias y las barras los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo. Letras distintas en una misma fecha representan diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El rectángulo de trazo discontinuo en el gráfico B incluye los frutos “listos para consumo” con valores de firmeza de ~4-13 N.

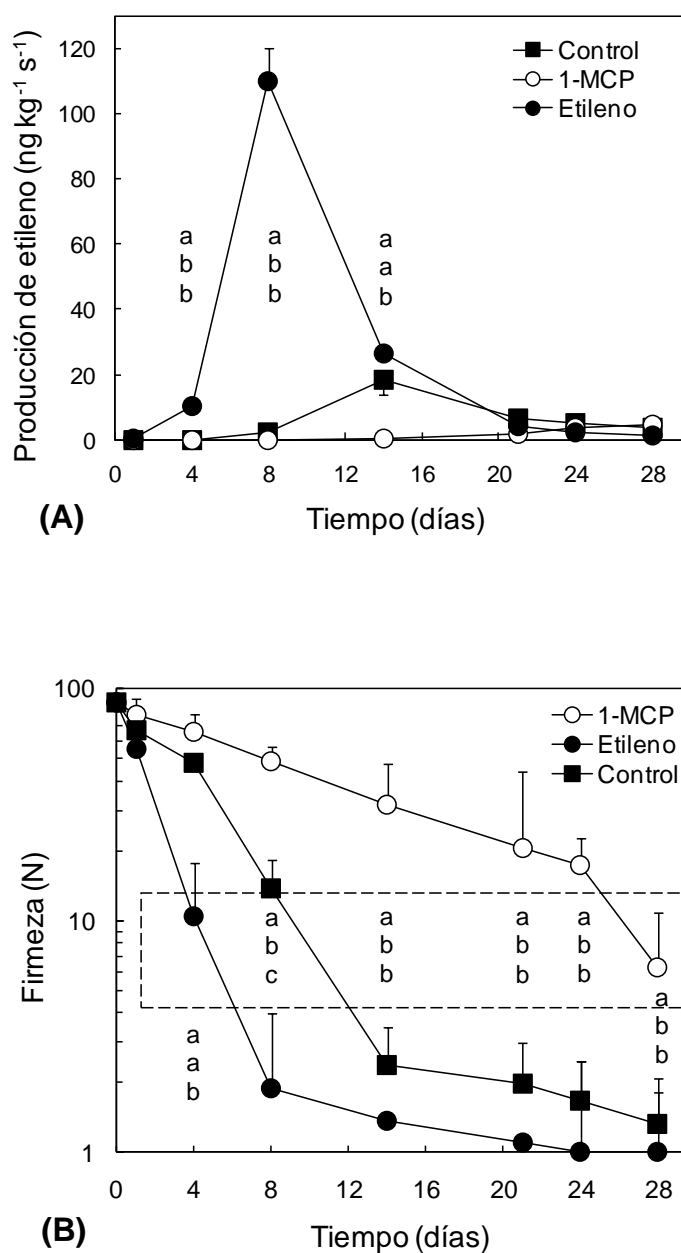


Figura 3.2 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis cosechados en Baradero.

Los kiwis se trataron con etileno $10 \mu\text{L L}^{-1}$ o con 1-MCP $1 \mu\text{L L}^{-1}$. Se utilizaron frutos no tratados como controles. Después de la aplicación de los tratamientos, los frutos se almacenaron a $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 28 d. Los valores representan las medias y las barras los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo. Las letras distintas en una misma fecha representan diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El rectángulo de trazo discontinuo en el grafico (B) incluye los frutos “listos para consumo” con valores de firmeza de ~4-13 N.

La expresión de los genes *KWACSI*, *KWACS2* y *KWACO1* se analizó mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa en el mesocarpo y la columela de los frutos de Mar del Sur (Figura 3.3).

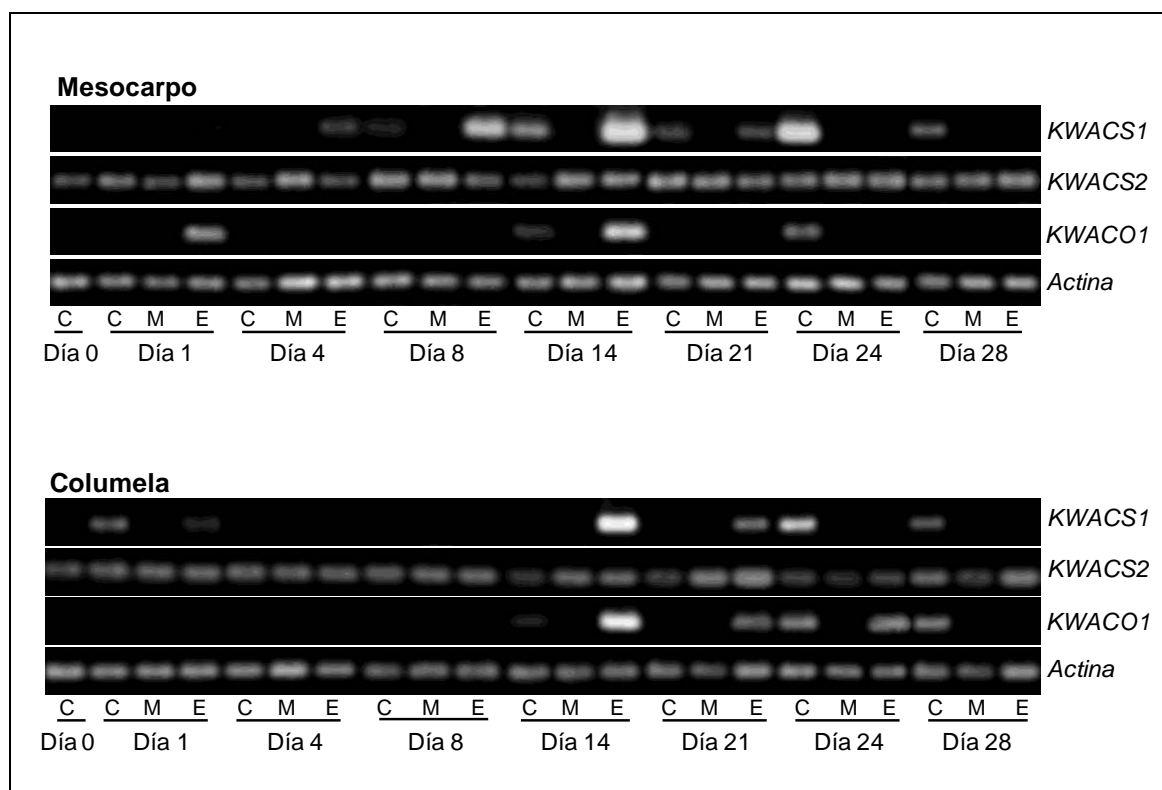


Figura 3.3 Acumulación de transcritos de *KWACSI*, *KWACS2* y *KWACO1* en el mesocarpo y la columela de los frutos de Mar del Sur en el Experimento 1.

Los frutos control (C) y los frutos tratados con etileno $10 \mu\text{L L}^{-1}$ (E) o 1-MCP $1 \mu\text{L L}^{-1}$ (M) se almacenaron a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 28 d. Los muestreos de tejidos para las extracciones de ARNm se realizaron los días 0, 1, 4, 8, 14, 21, 24 y 28. El gen de *Actina* se utilizó como un control interno para normalizar las cantidades del molde inicial.

En ambos tejidos, la expresión de transcritos de los genes *KWACSI* y *KWACO1* aumentó concomitantemente con la producción autocatalítica de etileno en los frutos control hasta alcanzar el pico en el día 24 (Figura 3.3). Los niveles de transcritos de *KWACSI* fueron considerablemente más altos en el mesocarpo que en la columela. Los transcritos de *KWACO1* en el mesocarpo se detectaron hasta el día 24, mientras que en la columela se evidenciaron hasta el día 28.

Los genes *KWACSI* y *KWACO1* tuvieron una respuesta marcada a los tratamientos con etileno. Las primeras acumulaciones de transcritos de *KWACSI* en el mesocarpo se detectaron en el día 4, las mismas tuvieron un importante aumento hacia

el día 14, acorde con el pico de producción de etileno registrado en ese día, y luego disminuyeron en el día 21. En la columela se detectó la expresión de *KWACSI* los días 14 y 21. Los niveles de los transcritos de *KWACOI* tuvieron un aumento transitorio en el mesocarpio en el día 1 después del tratamiento con el etileno y subió significativamente en ambos tejidos el día 14.

El gen *KWACS2* fue más estable en la expresión durante el ablandamiento del kiwi (Figura 3.3). No se pudo identificar la relación entre la expresión del gen *KWACS2* y la síntesis del etileno autocatalítico, pero los niveles de transcritos de *KWACS2* fueron relativamente más altos en el mesocarpio de los frutos tratados con 1-MCP del día 4 hasta el día 28.

En cambio, los tratamientos con 1-MCP confirmaron una relación directa entre la expresión de los genes *KWACSI* y *KWACOI* y la síntesis del etileno. No se detectó la expresión de los genes *KWACSI* y *KWACOI* en los frutos tratados con 1-MCP, independientemente del tejido considerado. El 1-MCP también inhibió el aumento transitorio de los transcritos *KWACSI* encontrados en la columela el día 1 (Figura 3.3).

3.2. Experimento 2: Aplicación de 1-MCP después de 40, 80 o 120 días de conservación a 0 °C con posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la firmeza y de la expresión de los genes *KWACSI*, *KWACS2* y *KWACOI*

Después de 40 d de conservación en frío, los frutos control de Mar del Sur almacenados a 20 ± 2 °C tardaron 12 d en iniciar la síntesis del etileno autocatalítico, registrándose el pico de producción de etileno en el día 18 (Figura 3.4, A). Aun así, los frutos control mostraron que la producción de etileno se incrementó de $0,48 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ después de 1 día a 20 ± 2 °C hasta $1,25 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ después de 5 d. Al contrario, los frutos tratados con el 1-MCP manifestaron niveles basales de producción del etileno: $0,32 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ el día 1, $0,2 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ el día 5, y, un máximo de $0,52 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ el día 18, sin mostrar un pico durante la duración del experimento (Figura 3.4, A).

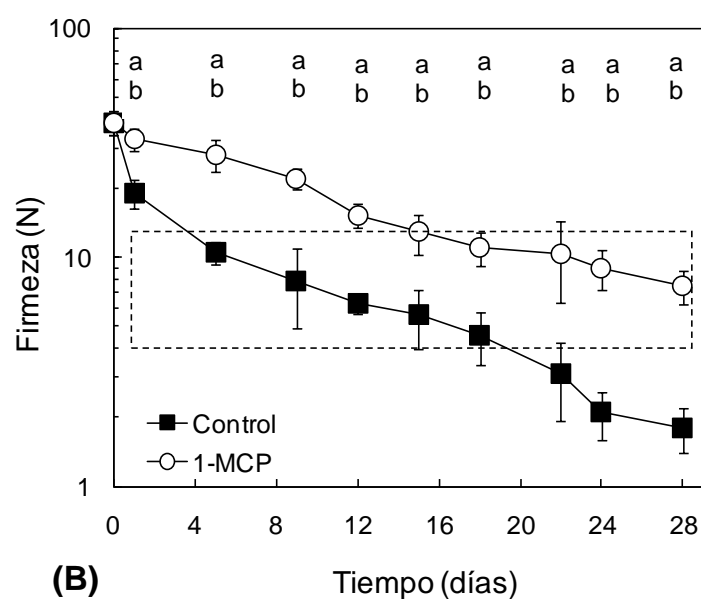
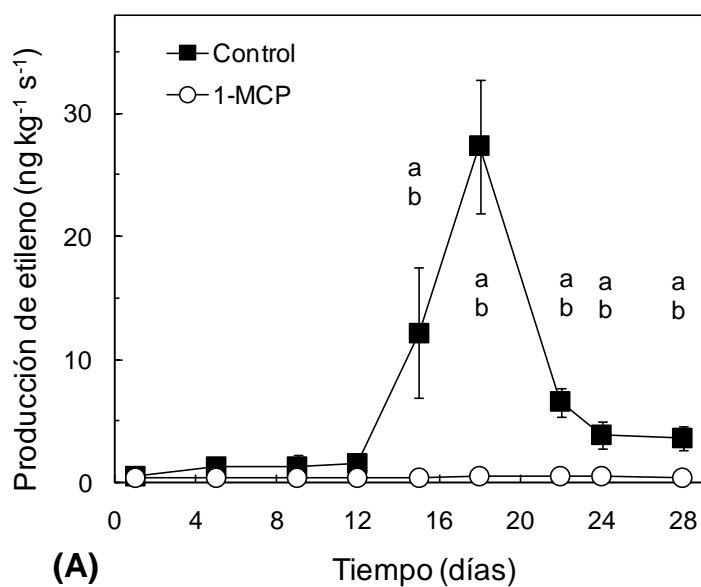


Figura 3.4 Producción de etileno (A) y firmeza (B) de frutos conservados a 0 °C durante 40 d y después tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Después de la aplicación de los tratamientos, los kiwis se almacenaron a 20 ± 2 °C durante 28 d. Los valores representan las medias y las barras los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo. Las letras distintas en una misma fecha representan diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El rectángulo de trazo discontinuo en el gráfico (B) incluye los frutos "listos para consumo" con valores de firmeza de ~4-13 N.

Los frutos control mostraron una tasa de ablandamiento más elevada que los frutos tratados con 1-MCP, presentando valores de firmeza muy bajos al final del experimento (Figura 3.4, B). Los frutos control alcanzaron el estado de consumo después de 4 d y se mantuvieron dentro del rango de consumo hasta el día 18. En cambio, los frutos tratados con 1-MCP se consideraron “listos para consumo” después de 18 d, siendo los valores de firmeza de 7,5 N en el día 28 (Figura 3.4, B).

La mayor acumulación de transcritos de *KWACS2* se encontró en los frutos control en los días 15 y 18, lo que coincidió con el pico de producción del etileno. *KWACS1* se expresó intensamente en los frutos control el día 18 en ambos tejidos, y ligeramente en la columela en los días 1 y 22 y en el mesocarpio el día 15 (Figura 3.5). *KWACO1* manifestó un pico de expresión en el mesocarpio y en la columela el día 18 (Figura 3.5). Como en el experimento 1, la asociación de *KWACS1* y *KWACO1* con la percepción del etileno fue confirmada por el tratamiento con 1-MCP, que inhibió la expresión de estos genes en todos los días del experimento en ambos tejidos.

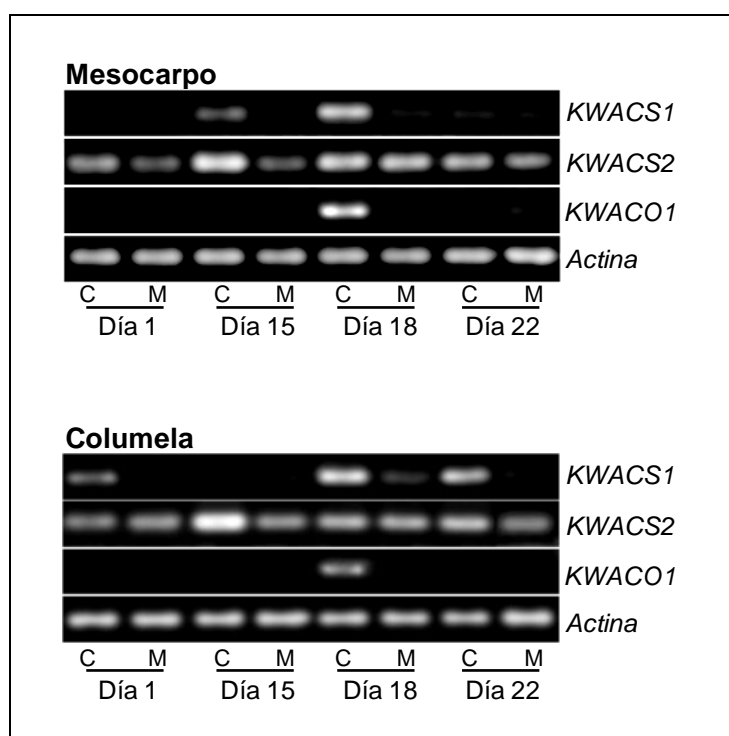


Figura 3.5 Acumulación de transcritos de *KWACS1*, *KWACS2* y *KWACO1* en el mesocarpio y en la columela de los frutos conservados a 0 °C durante 40 d y luego tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Después de la aplicación de los tratamientos, los kiwis se almacenaron a 20 ± 2 °C durante 28 d. El gen de *Actina* se utilizó como control interno para normalizar las cantidades del molde inicial.

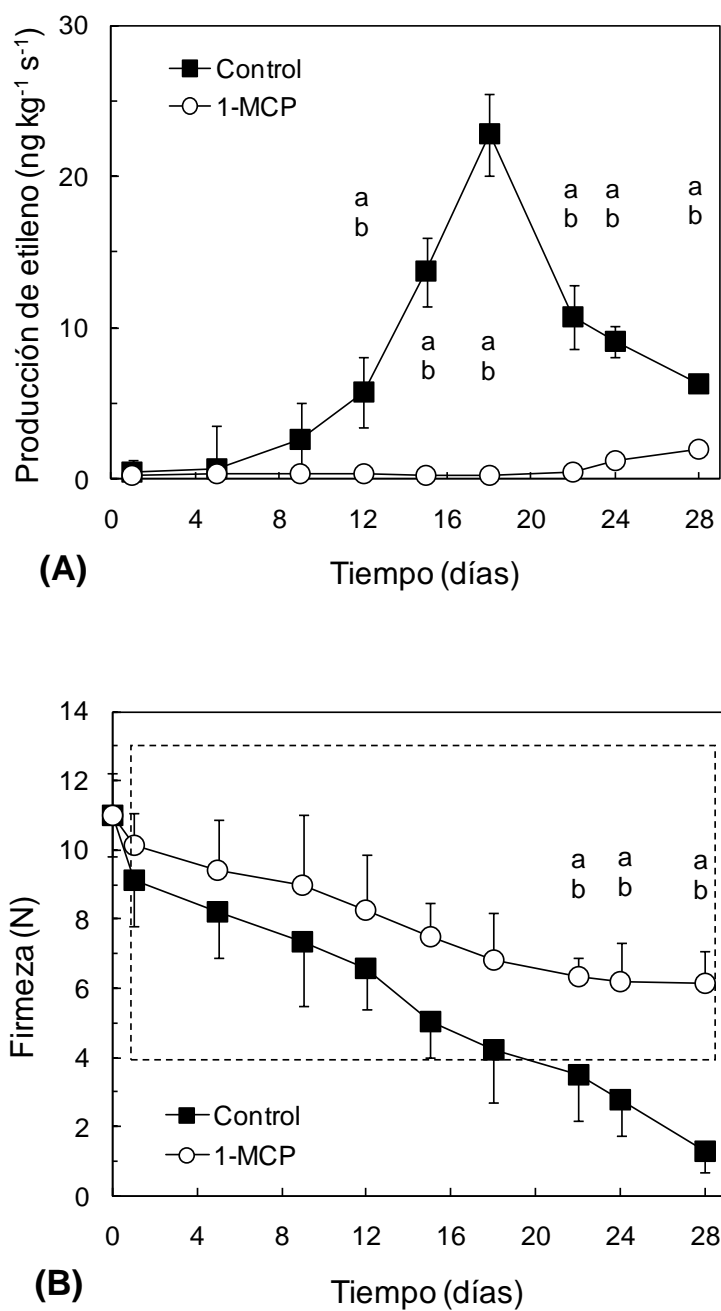


Figura 3.6 Producción del etileno (A) y firmeza (B) en kiwis conservados a 0 °C durante 80 d y después tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 µL L⁻¹.

Después de la aplicación de los tratamientos, los kiwis se almacenaron a 20 ± 2 °C durante 28 d. Los valores representan las medias y las barras los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo. Las letras distintas en una misma fecha representan diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El rectángulo de trazo discontinuo en el gráfico (B) incluye los frutos “listos para consumo” con valores de firmeza de ~4-13 N.

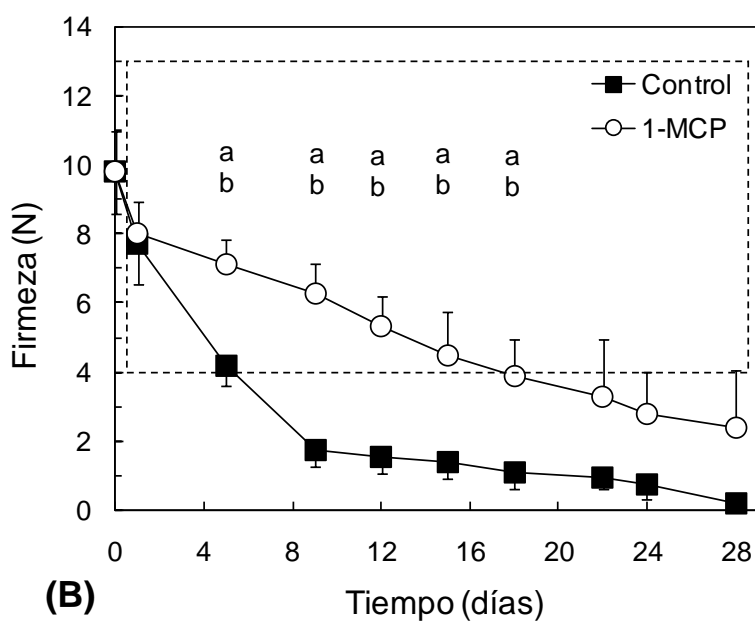
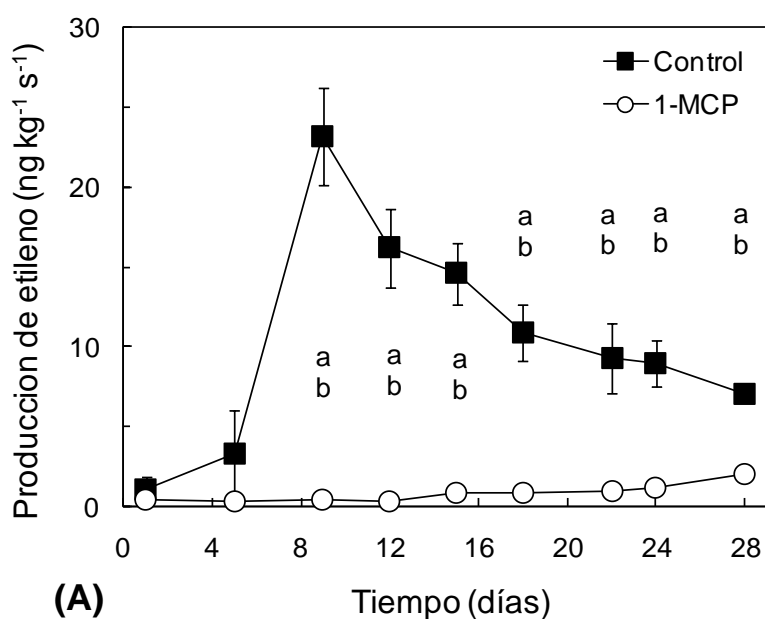


Figura 3.7 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis conservados a 0 °C durante 120 d y después tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 µL L⁻¹.

Después de la aplicación de los tratamientos, los kiwis se almacenaron a 20 ± 2 °C durante 28 d. Los valores representan las medias y las barras los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo. Las letras distintas en una misma fecha representan diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El rectángulo de trazo discontinuo en el gráfico (B) incluye los frutos “listos para consumo” con valores de firmeza de ~4-13 N.

Los frutos control expuestos a 0 °C por 40 (Fig. 3.4, A), 80 (Figura 3.6, A) o 120 d (Figura 3.7, A) mostraron, al ser transferidos a un ambiente a 20 °C, un adelantamiento del pico de producción de etileno con respecto a los controles de los frutos que nunca se expusieron al frío (Fig. 3.1, A). En éstos últimos, el pico de etileno se registró a los 24 d, mientras que en los frutos previamente sometidos a 40, 80 y 120 d, el pico de etileno se observó luego de 18, 18 y 9 d respectivamente. El 1-MCP aplicado después de la conservación en frío bloqueó en todos los casos la producción autocatalítica de etileno.

La firmeza de los frutos control después de 80 d de conservación en frío disminuyó rápidamente, cayendo de 11 a 4 N en 18 d, mientras que los frutos tratados con el 1-MCP se ablandaron a una tasa significativamente menor, de 11 a 6 N en 28 d, encontrándose en un estado apropiado para su consumo durante todo el transcurso del experimento (Figura 3.6, B).

Se produjo un descenso extremadamente rápido en la firmeza de los frutos control después de la conservación durante 120 d en frío. Después de 5 d de almacenamiento a 20 ± 2 °C los frutos control resultaron severamente deteriorados (Figura 3.7, B). Por otro lado, los frutos tratados con 1-MCP se ablandaron gradualmente y se mantuvieron en un estado apropiado para el consumo durante 15 d.

3.3. Experimento 3: Aplicación doble de 1-MCP después de 40 y 80 días de conservación a 0 °C y posterior almacenamiento a 20 °C. Evaluación de la firmeza y de la expresión de los genes *KWACS1*, *KWACS2* y *KWACO1*

Cuando el 1-MCP fue administrado dos veces, después de 40 d de conservación a 0 °C y luego de 80 d como segunda aplicación, los kiwis control almacenados a temperatura ambiente demostraron un aumento de la producción de etileno en el día 15 con el posterior pico en el día 18 (Figura 3.8, A). Los kiwis tratados con 1-MCP presentaron un nivel de producción del etileno más bajo respecto de los frutos control, aunque en el día 18 se detectaron niveles de $2,8 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

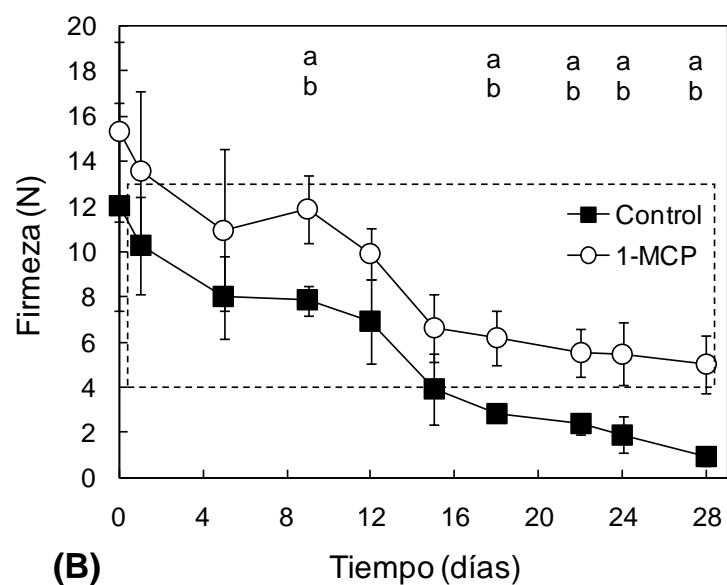
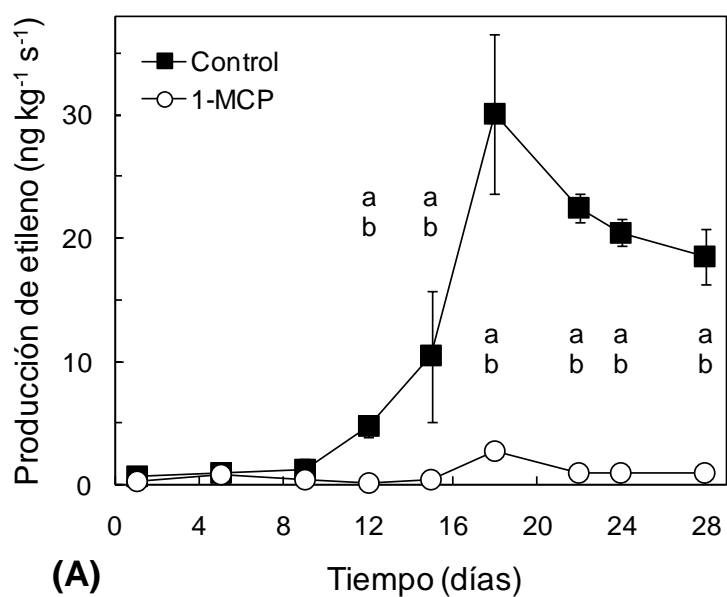


Figura 3.8 Producción de etileno (A) y firmeza (B) en kiwis conservados a 0 °C durante 80 d y luego tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ después de 40 d y después de 80 d de conservación a 0 °C.

Luego de la aplicación del segundo tratamiento con 1-MCP, los kiwis se almacenaron a 20 ± 2 °C. Los valores representan las medias y las barras los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo. Las letras distintas en una misma fecha representan diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El rectángulo de trazo discontinuo en el grafico (B) incluye los frutos “listos para consumo” con valores de firmeza de ~ 4 -13 N.

Los valores de la firmeza en el día 1 en los frutos tratados con el 1-MCP fueron más altos en este experimento (Figura 3.8, B) que en los frutos tratados con una sola dosis de 1-MCP (Figura 3.6, B). Sin embargo, la tasa del ablandamiento fue similar en ambos experimentos. De todos modos, los frutos tratados con 1-MCP tuvieron valores de firmeza más altos que los frutos control y, durante los 28 d de duración del experimento, se mantuvieron en un estado apropiado para el consumo. En cambio, los frutos control se deterioraron más allá del rango de aptitud para su consumo después del día 16 (Figura 3.8, B).

En el mesocarpio de los frutos control, los transcritos del gen *KWACS1* fueron detectados los días 1 y 15 (Figura 3.9), pero no se detectaron en el día 18 en que se generó la producción máxima del etileno. En la columela de los frutos control, los transcritos de *KWACS1* fueron detectados en los días 18 y 22. Los niveles de *KWACS2* en el mesocarpio y en la columela fueron relativamente bajos en el día 15, en los frutos control y en los tratados con 1-MCP. Las acumulaciones de los transcritos de *KWACO1* en los frutos control se detectaron en el mesocarpio en el día 18 y en la columela en los días 18 y 22. En los frutos tratados con 1-MCP no se detectaron acumulaciones de transcritos de *KWACS1* y *KWACO1*.

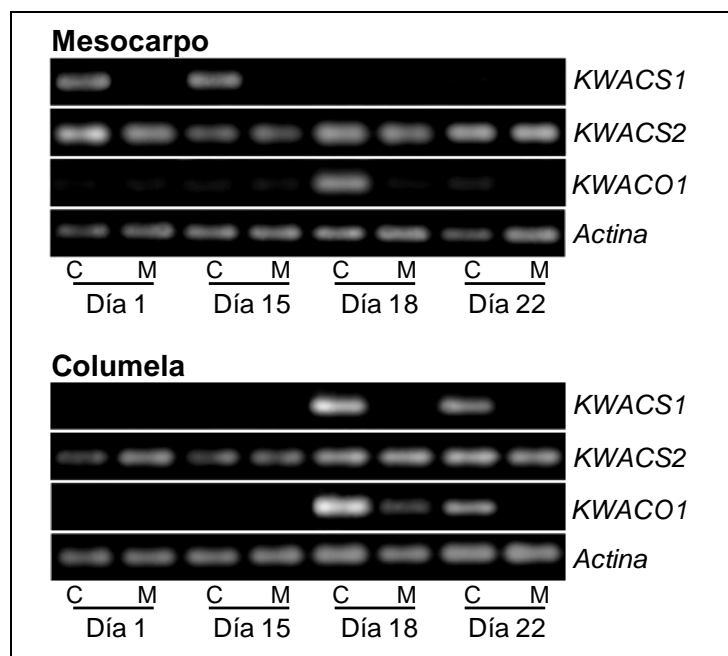


Figura 3.9 Acumulación de transcritos de *KWACS1*, *KWACS2* y *KWACO1* en el mesocarpio y en la columela en los frutos tratados (M) o no (C) con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ después de 40 d y después de 80 d de conservación a 0 °C.

3.4. Experimento 4: Obtención y análisis de las secuencias de *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1* y *Actina*

3.4.1. Obtención y análisis de la secuencia completa del gen *AdGAL1*

3.4.1.1. Secuencia de *AdGAL1* y su análisis bioinformático

Durante la realización de este trabajo de Tesis se obtuvo una secuencia completa de ADNc codificante de la enzima β -Gal, de la cual no había antecedentes publicados en kiwi. A la secuencia se le otorgó el nombre *AdGAL1* y se publicó en las bases de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), con el número de acceso: HQ108111.

La secuencia de nucleótidos de *AdGAL1* contiene 2334 pb en su totalidad, y está compuesta por una región 5' no codificante de 27 pb, una región codificante de 2187pb, y una región 3' no codificante de 120 pb que incluye el extremo poli(A) (Figura 3.10).

```

ttaaacagaaaaatcgtttggttcaatgtgggaaatgttgagaatcaaagttttgttcgtgtgtgtgggcttgttt
M W E M L R I K V L F V C V G L F
ttcttgttgtgtgtgtgtgttcggtgaccgcctcggtgacttacgatggcaaagccattaaaaatcaatggccaaagaagatt
F L L C C C S V T A S V T Y D G K A I K I N G Q R R I
ctgttttctgggtccattcactaccccagaagcaccctgagatgtggcctggtctgatacaaaaggcaaaagaaggagga
L F S G S I H Y P R S T P E M W P G L I Q K A K E G G
ttggatgttatataaacctatgtcttctggaatggacatgagccttctcctggacaatattatttcgaggggagggtacgat
L D V I Q T Y V F W N G H E P S P G Q Y Y F E G R Y D
ctggtgcgattcatcaaattggcgcaacaagctggcctctacgttcatctccgaatcggcctctacgtttgtgtgtgaatgg
L V R F I K L A Q Q A G L Y V H L R I G L Y V C A E W
aacttcgggggatttccagtttggcttaaatatgttcctggcattgtcttttagaacagacaatgggcctttcaaggctgca
N F G G F P V W L K Y V P G I A F R T D N G P F K A A
atgcaaaatttcacagagaaaaattgtcaacttgatgaagtgcagaaaaattgtttgagctcagggtgttccaattattatg
M Q K F T E K I V N L M K S E K L F E S Q G G P I I M
tctcagatagagaacgaatacggacccgtggaatgggaaatcggtgcacccgggaaggcatatacgaatgggcccagaa
S Q I E N E Y G P V E W E I G A P G K A Y T K W A A E
atggcagtggggctcgacaccggtgtcccggtgattatgtgcaacaagaggatgctcctgatcctattatagataacttgc
M A V G L D T G V P W I M C K Q E D A P D P I I D T C
aacgggttttactgcgaaggctttacaccgaacaagaactacaaaccgaaaaatgtggaccgaggcctggactggctgggtac
N G F Y C E G F T P N K N Y K P K M W T E A W T G W Y
acagaatttgggtggcccaatccataatagacctgtcgaagacttggcatattcagtcgcgagggtttatagagaataatggt
T E F G G P I H N R P V E D L A Y S V A R F I Q N N G
tcgttcgttaattattatgtaccatggaggaacgaatttggccgaacagctgctggcctatttgttgccactagctat
S F V N Y Y M Y H G G T N F G R T A A G L F V A T S Y
gattatgatgctccgattgatgaatatgggcttccgagagaaccgaaatggggacatttgagagacttgcataaaagccatc
D Y D A P I D E Y G L P R E P K W G H L R D L H K A I
aagctatgtgaacctgttttagtttccgcatatccaacagtgacttggcccgcaaaaatctggaggttcatgtatttaag
K L C E P S L V S A Y P T V T W P G K N L E V H V F K
tccaagtcgtcttgcgtgcgttcccttccaactatgaccccgagttctccggcaaaagtacaccttcagaatatgcaatat
S K S S C A A F L A N Y D P S S P A K V T F Q N M Q Y
gacctcctccttggccatcagcattcttccgagatgcagaatgcagtttcaacaccgcaagggttagctccaaagt
D L P P W S I S I L P D C K N A V F N T A R V S S K S
tcgcagatgaagatgacaccggtgagtggtggagcattttcttggcagtcatacattgaagaaaccgtctctgctgacgat
S Q M K M T P V S G G A F S W Q S Y I E E T V S A D D
tcagacacgattgcaaagaatggcttgtgggagcaaataagcatcacaaagatggctcggactacctgtggttacctcaca
S D T I A K N G L W E Q I S I T R D G S D Y L W Y L T
gatgtgaacatacaccccaacgaagggttctaaagaacggacagagtcctgttctaactgttatgtcagcaggtcacgct
D V N I H P N E G F L K N G Q S P V L T V M S A G H A
ttgcacgttttcatcaacgggcagcttgagggaactgtgtatgggtcactagagaatccaaagctgacatttagcaacaac
L H V F I N G Q L A G T V Y G S L E N P K L T F S N N
gtgaagttgagagccgggattaacaagatttcttactaagcgctgctgttggctcttccgaatgttggtttgcattttgag
V K L R A G I N K I S L S A A V G L P N V G L H F E
acatggaacacgggggttcttgggcccagtcacgttgaagggtctcaatgaggggacaagagacttgacaaagcaaaagtgg
T W N T G V L G P V T L K G L N E G T R D L T K Q K W
tcttacaagggttggcctaaaaggcgaagacttgagcctccatacacttagtggaggttccctcggttagtggtgacagggg
S Y K V G L K G E D L S L H T L S G S S S V E W V Q G
tcggtattggctcaaaagcaaccctaacatgggtacaaaggctactttcaatgcaccagaagggaatgatccgttggctttg
S L L A Q K Q P L T W Y K A T F N A P E G N D P L A L
gatatgaacaccatgggaaaaggcagatatggataaatggcgaaagtatcgggcgccactggcctgaatataaagctagt
D M N T M G K G Q I W I N G E S I G R H W P E Y K A S
ggtaactgtggcggtgtgtagctatgctggaatttataccgagaagaagtgcctaagcaattgtggagaggcctctcagaga
G N C G G C S Y A G I Y T E K K C L S N C G E A S Q R
tggtaccagttccacgctcgtggctgaaaccaagtgggaattttctgggtgtgttgaagaattgggtggtagaccaacc
W Y H V P R S W L K P S G N F L V V F E E L G G D P T
gggatttcgtttgttagaagaacaacttgaagtgtctgatgcacttgaaaggaagtgcattgggaagcaatcttgtttgca
G I S F V R R T T *
actgaaattctgcagtgcttttgattcatcgtctttcccaaaaaacgaaaaagataaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 3.10 Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de *AdGAL1*.

Las regiones no codificantes están marcadas en cursiva, el codón de inicio y el codón stop están coloreados de gris. La secuencia consenso de la familia 35 de glicosil hidrolasas está indicada en color turquesa.

El análisis de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos mediante el programa BLAST mostró la homología de *AdGAL1* con β -Gal de otros frutos (Cuadro 3.1).

Denominación del gen	Nombre de la especie	Numero de acceso GenBank	Nucleótidos (%)	Aminoácidos (%)
<i>TBG4</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF020390	78	80
<i>PpGAL1</i>	<i>Prunus persica</i>	EF568777	78	79
<i>CsGAL1</i>	<i>Citrus sinensis</i>	AY029198	78	77
<i>JP-GAL</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB046543	77	76
<i>PcGAL1</i>	<i>Pyrus communis</i>	AB086423	77	76
<i>pABG1</i>	<i>Malus x domestica</i>	L29451	77	76
<i>BG1</i>	<i>Capsicum annum</i>	AY029226	76	77
<i>PaGAL3</i>	<i>Persea americana</i>	AB252828	75	77
<i>pBG(a)</i>	<i>Carica papaya</i>	FJ859031	75	77
<i>beta-gal1</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	AJ278703	75	76
<i>AV-GAL</i>	<i>Persea americana</i>	AB061017	75	74
<i>pBG(b)</i>	<i>Carica papaya</i>	FJ859030	74	76

Cuadro 3.1 Porcentaje de identidad de *AdGAL1* en relación a las secuencias de genes codificantes de β -Gal de otros frutos.

El alineamiento se realizó mediante el programa BLAST.

El programa NCBI ORF Finder predijo que la secuencia de *AdGAL1* codifica para una proteína de 728 aminoácidos (Figura 3.10).

El programa SMART detectó que la secuencia de aminoácidos *AdGAL1* contiene la secuencia consenso de la familia 35 de glicosil hidrolasas: G-G-P-[LIVM](2)-X(2)-Q-X-E-N-E-[FY], donde X es cualquier aminoácido, [LIVM] y [FY] son componentes conservados (Figura 3.10). Dicha secuencia consenso se encontró en otras β -Gal, y su ubicación puede observarse en el alineamiento realizado mediante ClustalW de las secuencias de aminoácidos de *AdGAL1* (*Actinidia deliciosa*), *TBG4* (*Lycopersicon esculentum*), *PpGAL1* (*Prunus persica*), *JP-GAL* (*Pyrus pyrifolia*), *CsGAL1* (*Citrus sinensis*), *PcGAL1* (*Pyrus communis*), *pABG1* (*Malus x domestica*) y (Figura 3.11).


```

AdGAL1[Actinidia deliciosa]-----MWEMLRKIVLFCVGLFFLLCCCSVTASVTYDGKAIKINGQRILFSGSI 50
TBG4[Lycopersicon esculentum]-----MLRTNVLLLLV-ICLLDFSSVKASVSYDDRAIINGKRKILISGSI 46
PpGAL1[Pyrus pyrifolia]-----MGVGIGT-MWSILLFSCIFSAASASVSYDHKAIINGQKRILISGSI 47
CsGAL1[Citrus sinensis]-----MLGANVKVSMVLVLLSFCSEISFVKASVSYDHKAVIINGQKRILISGSI 48
JP-GAL1[Pyrus pyrifolia]-----MGVGIGT-MWSILLFSCIFSAASASVSYDHKAIINGQKRILISGSI 47
PcGAL1[Pyrus communis]-----MGVGIGT-MWSILLFSCIFSAASASVSYDHKAIINGQKRILISGSI 47
pABG1[Malus x domestica]-----MGVGIGT-MWSILLFSCIFSAASASVSYDHKAIINGQKRILISGSI 47
                                     *** ** * *** ** **

AdGAL1[Actinidia deliciosa]-----HYPRSTPEMWPGLIQKAKEGGLDVIQTYVFWNGHEPSPGQYFEGRYDLVRFIKLAQQAG 110
TBG4[Lycopersicon esculentum]-----HYPRSTPQMWPDLIQKAKDGGGLDVIQTYVFWNGHEPSPGKYNFEGRYDLVRFIKMVQRAG 106
PpGAL1[Pyrus pyrifolia]-----HYPRSTPEMWPDLIQKAKDGGGLDVIQTYVFWNGHEPSPGKYFEDRYDLVRFIKLVQQAG 107
CsGAL1[Citrus sinensis]-----HYPRSTPEMWPDLIQKAKDGGGLDVIQTYVFWNGHEPTQGNYYFQDRYDLVRFIKLVQQAG 120
JP-GAL1[Pyrus pyrifolia]-----HYPRSTPEMWPDLIQKAKDGGGLDVIQTYVFWNGHEPSPGKYFEDRYDLVRFIKLVQQAG 107
PcGAL1[Pyrus communis]-----HYPRSTPEMWPDLIQKAKDGGGLDVIQTYVFWNGHEPSPGKYFEDRYDLVRFIKLVQQAG 107
pABG1[Malus x domestica]-----HYPRSTPEMWPDLIQKAKDGGGLDVIQTYVFWNGHEPSPGNYYFEERYDLVRFIKLVQQAG 107
                                     ***** ** * ***** ***** * * * ***** ** *

AdGAL1[Actinidia deliciosa]-----LYVHLRIGLYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGIAFRTDNGPFKAAMQKFTKIVNLMKSEKLF 170
TBG4[Lycopersicon esculentum]-----LYVNLRIIGPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGMEFRTNNQPFKAMQGFVQKIVNMMKSENLF 166
PpGAL1[Pyrus pyrifolia]-----LFVNLRIIGPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGIAFRTDNEPFKAAMQKFTKIVSMMAEKLF 167
CsGAL1[Citrus sinensis]-----LYVHLRIGPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGIEFRTDNGPFKAAMHKTTEKIVSMMAEKLF 180
JP-GAL1[Pyrus pyrifolia]-----LFVNLRIIGPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGIAFRTDNEPFKAAMQKFTKIVSMMAEKLF 167
PcGAL1[Pyrus communis]-----LFVNLRIIGPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGIAFRTDNEPFKAAMQKFTKIVSMMAEKLF 167
pABG1[Malus x domestica]-----LFVNLRIIGPYVCAEWNFGGFPVWLKYVPGIAFRTDNEPFKAAMQKFTKIVSMMAEKLF 167
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AdGAL1[Actinidia deliciosa]-----ESQGGPIIMSQIENEFGPVEWEIGAPGKAYTKWAAQMAVGLDTGVPWIMCKQEDADPPII 230
TBG4[Lycopersicon esculentum]-----ESQGGPIIMAQIENEFGPVEWEIGAPGKAYTKWAAQMAVGLKTGVPWIMCKQEDADPVI 226
PpGAL1[Pyrus pyrifolia]-----QTQGGPIILSQIENEFGPVEWEIGAPGKAYTKWAAQMAVGLDTGVPWIMCKQEDADPVI 227
CsGAL1[Citrus sinensis]-----QTQGGPIILSQIENEFGPVEWDIGAPGKAYAKWAAQMAVGLNTGVPWIMCKQEDADPVI 240
JP-GAL1[Pyrus pyrifolia]-----QTQGGPIILSQIENEFGPVEWEIGAPGKAYTKWAAQMAVGLDTGVPWIMCKQEDADPVI 227
PcGAL1[Pyrus communis]-----QSQGGPIILSQIENEFGPVEWEIGAPGKAYTKWAAQMAVGLDTGVPWIMCKQEDADPVI 227
pABG1[Malus x domestica]-----QTQGGPIILSQIENEFGPVEWEIGAPGKAYTKWAAQMAVGLDTGVPWIMCKQEDADPVI 227
                                     ***** ** * ***** ***** ** * ***** ** *

AdGAL1[Actinidia deliciosa]-----DTCNGFYCEGFTPNKNYKPKMWTEAWTGWYTEFGGPIHNRPVEDLAYSVARFIQNGSFFV 290
TBG4[Lycopersicon esculentum]-----DTCNGFYCEGFRPNKYKPKMWTEVWVGWYTKFGGPIQORPAEDIAFVSARFVQNGSFF 286
PpGAL1[Pyrus pyrifolia]-----DTCNGFYCENFKPNKDYKPKMWTEVWVGWYTEFGGAVPTRPAEDVAFVSARFIQSGGSFL 287
CsGAL1[Citrus sinensis]-----NTCNGFYCEKFPVNPQNYKPKMWTEAWTGWYTEFGSAVPTPRAEDLVFSARFIQSGGSFI 300
JP-GAL1[Pyrus pyrifolia]-----DTCNGFYCENFKPNKDYKPKMWTEVWVGWYTEFGGAVPTRPAEDVAFVSARFIQSGGSFL 287
PcGAL1[Pyrus communis]-----DTCNGFYCENFKPNKDYKPKMWTEVWVGWYTEFGGAVPTRPAEDVAFVSARFIQSGGSFL 287
pABG1[Malus x domestica]-----DTCNGFYCENFKPNKDYKPKMWTEVWVGWYTEFGGAVPTRPAEDVAFVSARFIQSGGSFL 287
                                     ***** ** * ***** ***** ** * ***** ** *

```

Figura 3.11 Fragmento de alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de *AdGAL1* (*Actinidia deliciosa*), *TBG4* (*Lycopersicon esculentum*), *PpGAL1* (*Prunus persica*), *CsGAL1* (*Citrus sinensis*), *JP-GAL* (*Pyrus pyrifolia*), *PcGAL1* (*Pyrus communis*) y *pABG1* (*Malus x domestica*) mediante el programa ClustalW.

La secuencia consenso de la familia 35 de glicosil hidrolasas está indicada en color turquesa. Con asteriscos se señalan los aminoácidos idénticos.

El análisis bioinformático de la secuencia de *AdGAL1* se realizó utilizando el programa SignalP que predijo la presencia del péptido señal y el sitio de clivaje entre los aminoácidos 27 y 28. El programa TargetP permitió confirmar que el producto final del gen es secretado.

El programa PeptidMass predijo que el peso molecular de la proteína madura es de 81,12 kDa y el punto isoelectrico teórico es de 7,50.

Además, el programa SMART demostró que *AdGAL1* tiene un dominio correspondiente a la súper familia 42 de glicosil hidrolasas, que se superpone con el dominio de la familia 35.

3.4.1.2. Análisis filogenético de *AdGAL1*

El análisis filogenético de la secuencia completa de *AdGAL1* se realizó mediante el programa MEGA 4. La secuencia de aminoácidos de *AdGAL1*, junto con otras 32 secuencias de β -Gal, se alineó mediante ClustalW y se construyó el árbol filogenético utilizando el método del llamado “vecino más cercano”, conocido en inglés como ‘Neighbor Joining’. Se empleó la secuencia del gen *LACA* de *Aspergillus niger* como grupo externo – ‘outgroup’ (Figura 3.12).

El método estadístico que estimó las distribuciones por creación repetida y análisis de conjuntos de datos artificiales fue el análisis de remuestreo ‘bootstrap’ con 1000 réplicas. Los números de acceso del GenBank de las secuencias utilizadas están indicados en la Cuadro 4 de la sección 2.3.24.

El resultado obtenido indicó que la secuencia de *AdGAL1* se encuentra apareada junto con las secuencias *PpGAL1* y *PpGAL2* de *Prunus persica*, *PpGAL5* de *Pyrus pyrifolia* y *TBG6* de *Solanum lycopersicum* armando un grupo fuerte con el número de ‘bootstrap’ igual al 100 (Figura 3.12).

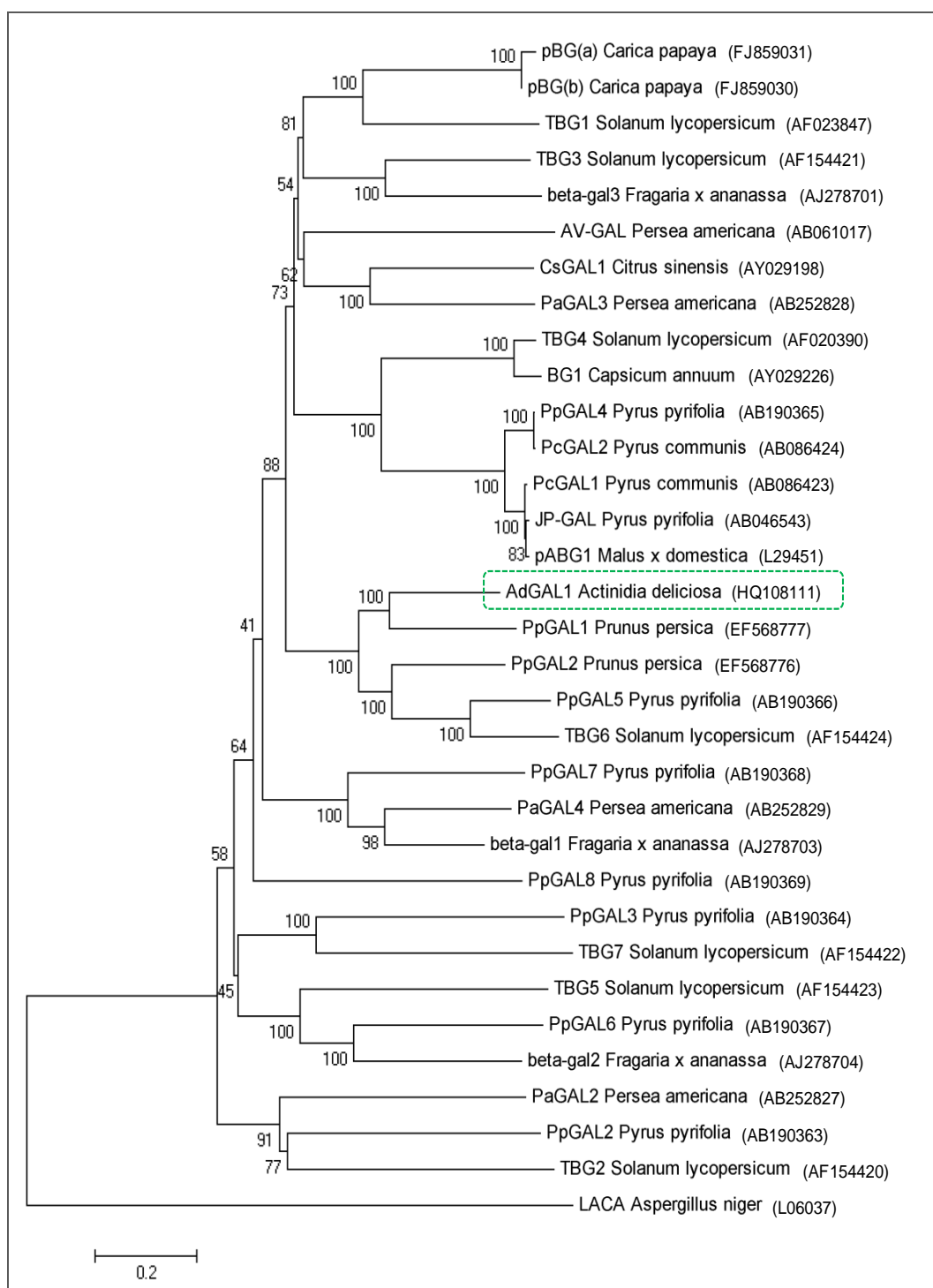


Figura 3.12 Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de β -Gal de plantas construido mediante el programa MEGA 4.

Se utilizó el método ‘Neighbor Joining’ y el análisis de ‘bootstrap’ de 1000 réplicas, donde los porcentajes de los valores de ‘bootstrap’ se indican sobre de las ramas. La secuencia del gen *LACA* de *Aspergillus niger* se empleó como ‘outgroup’. El gen *AdGAL1* se indica en un recuadro punteado. Los números de acceso del GenBank de las secuencias utilizadas se señalan entre paréntesis.

3.4.2. Obtención y análisis de la secuencia parcial del gen *AdARF/XYLI*

Se obtuvo una secuencia parcial codificante de una enzima bifuncional α -Ara/ β -Xil, a partir de un ARNm de un fruto maduro de kiwi, que se denominó *AdARF/XYLI*. Es la primera comunicación de una secuencia codificante de una α -Ara/ β -Gal en kiwi. La secuencia de *AdARF/XYLI* se publicó en el GenBank, otorgándosele el número de acceso HQ108113.

La secuencia parcial de *AdARF/XYLI* contiene 1928 pb, e incluye la región 3' no codificante y el extremo poli(A) (Figura 3.13).

```

gatgaagcaagggcaatgtacaacggaggcatggcggggctgaccttctggagcccaaactggaacatat
ttcgagaccctcggtggggccggggacaagagactcccgggtgaagaccccatgttagccggttaactacgc
cgccagctacgtcaggggtctacagggaaacgacgggtgaacgggtgaaggtcgcgccctgttgcaagcac
tacacggcatacagacctcgataactggaggggggtcgatcgcttccactttaatgctcgggtaagcaaac
aggacattaaagatacgttcgagataaccatttagagagtgcgtggttaggaggggaaggtggcgagcggttat
gtgctcttacaaccagggtcaatggcatccccacctgcgctaaccctaaactcctcaaagggaaccattcgc
ggcagttggcgactcaacgggtacatagtttcggattgtgactcgggttgagttttctttgagaatcaac
actatacatcaaaaccagaagaagcagttgcagctgcaattaaagcaggtttggatttggttggtggcc
gttccttgcaatccatactgaggcgccgtaagaaggggactcgtaagccagcttgaaattaactggggcc
ttagcaaacacgatgacggcccgatgaggttgggtatgttcgacggcgaaccgtcgggccaccaatacgc
gcaacctagggcccaagagacgtgtgcaccccggtcaccaacagctagcccttgaaagctgctaggcaagg
cattgttctactggagaaccgtgggcgttcacttcctctctcaatcaggcgccataggacagtagcagta
attgggcccattctgatgttactgtcacaatgattggaaattacgctggtggtgcatgtggttacacta
caccctacaaggaattgggaggtacacaaggaccatacaccaagcgggggtgcacagatgttcattgcaa
cggaaaccaactatattgggtgctgctgaggccgcagcaagacaggctgatgcaactgtcttggtaatgggc
cttgaccaatccattgaagccgaattcgttagaccgagccggtcccccttttgccaggacaccaacaggagc
tagtgctccagagtggccaggccctctagaggcccaaccatcttggtcttgatgtctggtggcccaattga
tgtcacgttcgcaaagaacgatccacgcattagcgctattatattgggttgggtaccctggccaagccgga
ggaactgccatagccgatgttctatttgggaccacaaaccaggaggaaagcttcccatgacatggtacc
cccaaaactatgtaacccatttgccaatgacagatatggccatgagggcagaccagcaagaggctaccc
tggcaggacctacaggttctacagagggccagttgtcttccatttgggtctgggcctaagctacacaact
tttgccacaatctggcacatgggcccacattgggtctccgtgcctctcaccagcctaaaagccaccgcaa
actcaaccatgctgagcaagctgtgagagtgcacgcggactgtaatgcaactctccccctggacgt
acacgtggatgttaaaaacactggatccatggatgggacccacactcttctggtgttcacaagcccacca
gatggaaaatgggcccagtaagcagctggtgggttttcacaagatccatatagcagccgggtcggaga
cacgggtcagaattgctgttcattgtgtgcaagcacctcagcgttggtggaccggtttgggatccgaagaat
tccactgggtgaacacaagcttcaaatcggtgacctcagccatcacgtctcccttcaaaccaattcggga
gaaattaaggttaggggctatcaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Figura 3.13 Secuencia parcial de nucleótidos de *AdARF/XYLI* (1928 pb).

El codón stop está marcado en color gris. La región 3' no codificante y el extremo poli(A) se indican en cursiva.

El análisis de la secuencia de nucleótidos mediante el programa BLASTN demostró que *AdARF/XYLI* tiene homología con otras α -Ara/ β -Xil (Cuadro 3.2), y que contiene el dominio C terminal de la familia glicosil hidrolasa 3.

Denominación del gen	Nombre de la especie	Numero de acceso GenBank	Nucleótidos (%)
<i>PpARF/XYL</i>	<i>Prunus persica</i>	AB264280	99
<i>MdARF/XYL1</i>	<i>Malus x domestica</i>	GU937612	79
<i>PpARF2</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB195230	78
<i>Xyl1</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	AY486104	77
<i>ARF</i>	<i>Citrus unshiu</i>	AB364643	72

Cuadro 3.2 Porcentaje de identidad de *AdARF/XYL1* en relación a las secuencias de genes codificantes de α -Ara/ β -Xil de otros frutos.

El alineamiento se realizó mediante el programa BLASTN.

3.4.3. Obtención y análisis de la secuencia parcial del gen *AdARF1*

Se obtuvo un fragmento de la secuencia putativamente codificante de la enzima α -Ara, a partir de ARNm de un fruto maduro de kiwi, y se lo denominó *AdARF1*. Es la primera comunicación de una secuencia codificante de una α -Ara en kiwi. La secuencia de *AdARF1* se publicó en el GenBank, otorgándosele el número de acceso HQ108110. La secuencia de nucleótidos de *AdARF1* contiene 284 pb (Figura 3.14).

```
ttcgaggagattaatcacgctggtgctggcgggctatgggctgagcttgtaagcaacggaggttttgaag
ctggggggccctaacgttccttccaacattgaaccttggtctataattgggaatgagtcattcttgatagt
gtcaacggaccgttcttcatgctttgaccgcaacaagggtgcacttcgaatagaggtgctatgtgatagc
caagggtgccggtagctgccctgatgggtgtaggaatttataatcctgggttctggggcatgaatatcg
agga
```

Figura 3.14 Secuencia parcial de nucleótidos de *AdARF* (284 pb).

El análisis de la secuencia de nucleótidos de *AdARF1* mediante el programa BLASTN demostró su homología con otras α -Ara (Cuadro 3.3).

Denominación del gen	Nombre de la especie	Numero de acceso GenBank	Nucleótidos (%)
<i>PpARF1</i>	<i>Prunus persica</i>	DQ486870	98
<i>PsARF1</i>	<i>Prunus salicina</i>	DQ822467	96
<i>AFase1</i>	<i>Malus x domestica</i>	AY309436	90
<i>PPARF1</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB073311	89
<i>Ara1</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	EF635628	89

Cuadro 3.3 Porcentaje de identidad de *AdARF1* en relación a las secuencias de genes codificantes de α -Ara de otros frutos.

El alineamiento se realizó mediante el programa BLASTN.

3.4.4. Obtención y análisis de la secuencia parcial del gen *AdPLI*

Se obtuvo un fragmento de la secuencia putativamente codificante de la enzima PL, aislada de ARNm de un fruto maduro de kiwi, y se lo denominó *AdPLI*. Es la primera comunicación de una secuencia codificante a una PL en kiwi. La secuencia de *AdPLI* se publicó en el GenBank, otorgándosele el número de acceso HQ108112.

La secuencia de nucleótidos de *AdPLI* contiene 712 pb que incluye la región 3' no codificante y el extremo poli(A) (Figura 3.15).

```

atacacgattgcaagcaaggggggaatgctatggtgcgggactccccacggcacttcgggtggaggacga
tatcggaacggcgacgggggtatcgatcttcggcgggacccacgtgtgggtggaccattgtccttgtcaaa
ttgcaatgatgggctgattgatgcaatccatgggttcattctgctattaccatctcgaacaattacatgacc
caccatgataaggtcatgctcttggggcacagtgattcatacaccaggacaagaacatgcaagtcacca
tcgccttcaatcactttggggaaggccttgttcaaagaatgccaaagttaggcattgggtatttccatgt
ggtgaacaatgactacactcactgggaaatgtatgccatcggtggcagtgccgatcccaccattaacagc
caaggaaaccgatacttggccctgtcaaccctttcgctaaagaggttaaccatagagttgacggtaatg
gtgtgtggagccactggaattggagatcagaaggagatcttatgctgaatggagccttcttactgcatc
aggcgcgggcgctgcagcgagctatgccagggcctcgagcttgggggccaagtcctcctccatggtaggc
tccattacttctggtgctggcgctcttcgctgccgaagaggactacagtgttagtctaaagcggaagg
aaaaaaaaa

```

Figura 3.15 Secuencia parcial de nucleótidos de *AdPLI* (710 pb).

El codón stop está marcado en color gris. La región 3' no codificante y el extremo poli(A) están indicados en cursiva.

El análisis de la secuencia de nucleótidos de *AdPLI* mediante el programa BLASTN demostró su homología con otras PL (Cuadro 3.4.) y la presencia del dominio de la familia Pec_lyase_C.

Denominación del gen	Nombre de la especie	Numero de acceso GenBank	Nucleótidos (%)
<i>MdPLI</i>	<i>Malus x domestica</i>	AY376878	82
<i>Pm65</i>	<i>Prunus mume</i>	AB218786	81
<i>PpPLI</i>	<i>Prunus persica</i>	AB264095	81
<i>PLI</i>	<i>Fragaria chiloensis</i>	EF441273	79

Cuadro 3.4 Porcentaje de identidad de *AdPLI* en relación a las secuencias de genes codificantes de PL de otros frutos.

El alineamiento se realizó mediante el programa BLASTN.

3.4.5. Obtención y análisis de la secuencia parcial de *Actina*

Se obtuvo una secuencia de 245 pb codificante para el gen de *Actina* de fruto de kiwi (Figura 3.16). Esta secuencia se publicó en las bases de datos del GenBank con el número de acceso DQ682826.

```
tccttcgtcttgaccttgctggccgtgatctaacagatgccctcatgaagatccttaccgagagaggtta
catgttcaccaccacggccgaacgggaaattgtccgtgacatgaaggaaaaacttgcatatgtcgcaactt
gactatgagcaggagctggagacagcaaagagcagctcctcagttgagaagaactatgagctacctgatg
gtcagggtcatcacaattggagctgagagattccgt
```

Figura 3.16 Secuencia parcial de nucleótidos de *Actina* de kiwi (245 pb).

El análisis de esta secuencia en el programa BLASTN demostró alta homología tanto con la secuencia de actina de *Actinidia deliciosa* que fue publicada luego del registro de nuestra secuencia (Figura 3.16) en el GenBank, como también con las secuencias de actina de otras especies vegetales (Cuadro 3.5).

Denominación del gen	Nombre de la especie	Numero de acceso GenBank	Nucleótidos (%)
<i>Act1</i>	<i>Actinidia deliciosa</i>	EF063572	97
<i>Act3</i>	<i>Camillia sinensis</i>	FJ355923	94
<i>Act1</i>	<i>Vitis vinifera</i>	AY680701	90
<i>actin</i>	<i>Prunus persica</i>	AB046952	89
<i>actin</i>	<i>Carica papaya</i>	AY906938	88

Cuadro 3.5 Porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos de *Actina* en relación a las secuencias de actina de otros frutos.

El alineamiento se realizó mediante programa BLASTN.

3.5. Experimento 5: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante el crecimiento y desarrollo de los frutos

A fin de estudiar la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante el crecimiento y el desarrollo de los frutos de kiwi, se confeccionó una curva de crecimiento a partir de las mediciones de peso fresco. La duración de la ontogenia del fruto fue de 198 d desde antesis, la cual se subdividió en cuatro Fases: I – multiplicación celular, II – “plateau” con disminución de la tasa de

crecimiento, III – agrandamiento celular, IV – maduración del fruto (Figura 3.17). La Fase IV de esta figura sólo representa el Estadio 1 de maduración, en que se produce un ablandamiento inicial lento.

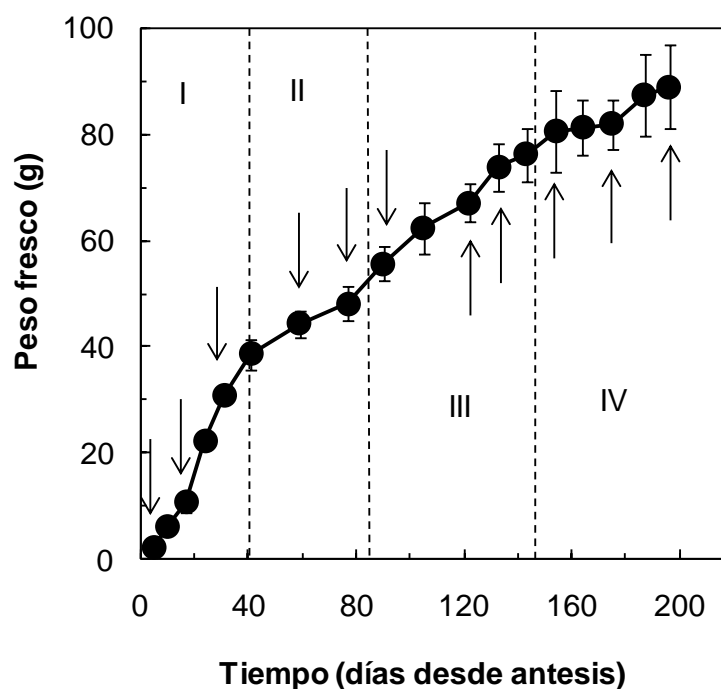


Figura 3.17 Variación del peso fresco durante el crecimiento y el desarrollo del kiwi.

Los puntos representan las medias y las barras verticales los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo. Los números romanos indican las 4 fases de crecimiento: la Fase I – multiplicación celular, la Fase II – “plateau” con disminución de la tasa de crecimiento, la Fase III – agrandamiento celular, y la Fase IV – primera etapa de la maduración del fruto. Las flechas indican los días de muestreos para extracción de ARNm.

El patrón de crecimiento se asemejó a una curva sigmoidea doble (Figura 3.17). En la Fase I, de aproximadamente 40 d de duración, el peso de los frutos aumentó rápidamente y alcanzó los 40 g. En la Fase II disminuyó marcadamente la tasa de crecimiento puesto que los frutos aumentaron solamente 7-8 g de peso fresco en los siguientes 41 d. Sin embargo, en la siguiente Fase III, donde ocurre un agrandamiento celular, el aumento de peso fue de 30 g. Finalmente, en la Fase IV, que corresponde al Estadio 1 de la maduración, el fruto alcanzó su madurez fisiológica con el peso final que fue de aproximadamente 90 g.

A partir de los 60 d desde antesis, el fruto alcanzó prácticamente su tamaño final, correspondiendo las ganancias posteriores al peso más que al tamaño, dado que tanto el largo como el diámetro del fruto experimentaron solamente leves modificaciones hasta el final de la etapa de crecimiento (Figura 3.18).

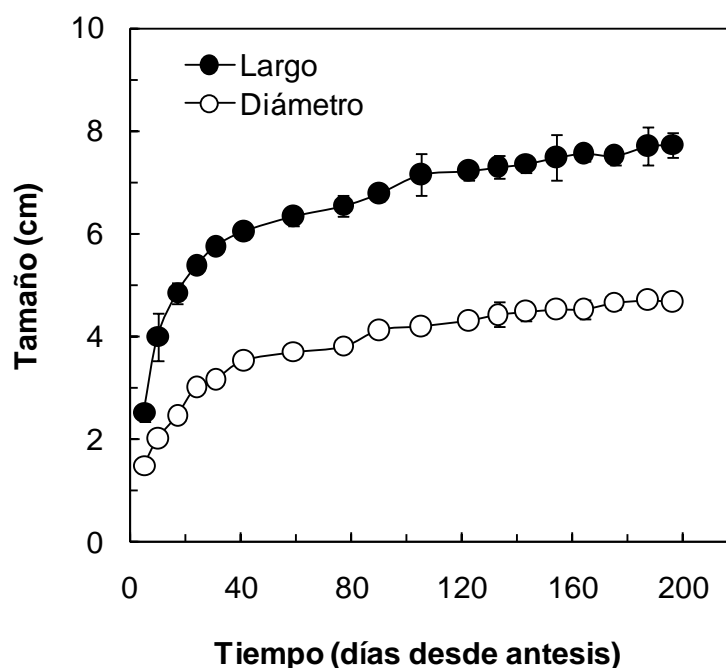


Figura 3.18 Variación del tamaño de los frutos durante el crecimiento y el desarrollo del kiwi.

Los puntos representan las medias y las barras verticales los desvíos estándar. Cuando las barras no son visibles, el desvío no excede el tamaño del símbolo.

La acumulación de los transcritos de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* fue determinada para los días 5, 17, 31 (Fase I), 59, 82 (Fase II), 90, 111, 133 (Fase III), y 154, 175 y 196 (Fase IV, Estadio 1) DDA (Figura 3.19).

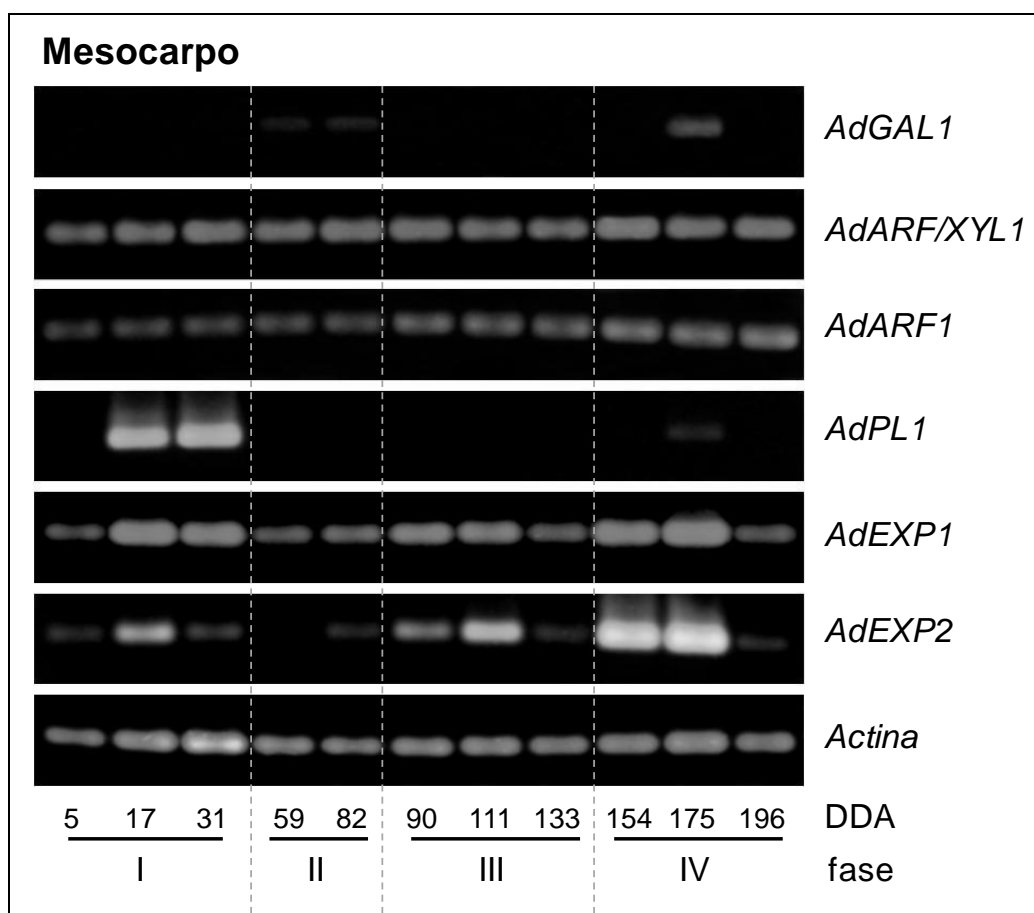


Figura 3.19 Expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en el mesocarpo durante el crecimiento y desarrollo del kiwi.

Los muestreos para las extracciones de ARNm se realizaron los días: 5, 17, 31, 59, 82, 90, 111, 133, 154, 175 y 196, y están indicados con números arábigos (DDA – días después de antes). Las fases del desarrollo del fruto están marcadas con los números romanos. El gen de *Actina* se utilizó como un control interno para normalizar las cantidades del molde inicial.

En el mesocarpo se detectaron bajos niveles de transcritos de *AdGAL1* en los días 59, 82 y 175 (Figura 3.19), mientras que en la columela la expresión del gen *AdGAL1* se detectó durante todo el período de crecimiento aumentando sus niveles en la fase de la maduración (Figura 3.20).

Las acumulaciones de los transcritos de *AdARF/XYL1* y *AdARF1* tuvieron un patrón de expresión similar durante el crecimiento del fruto, en el mesocarpo (Figura 3.19) y en la columela (Figura 3.20), a excepción de la Fase IV donde la expresión de *AdARF/XYL1* disminuyó (Figura 3.20).

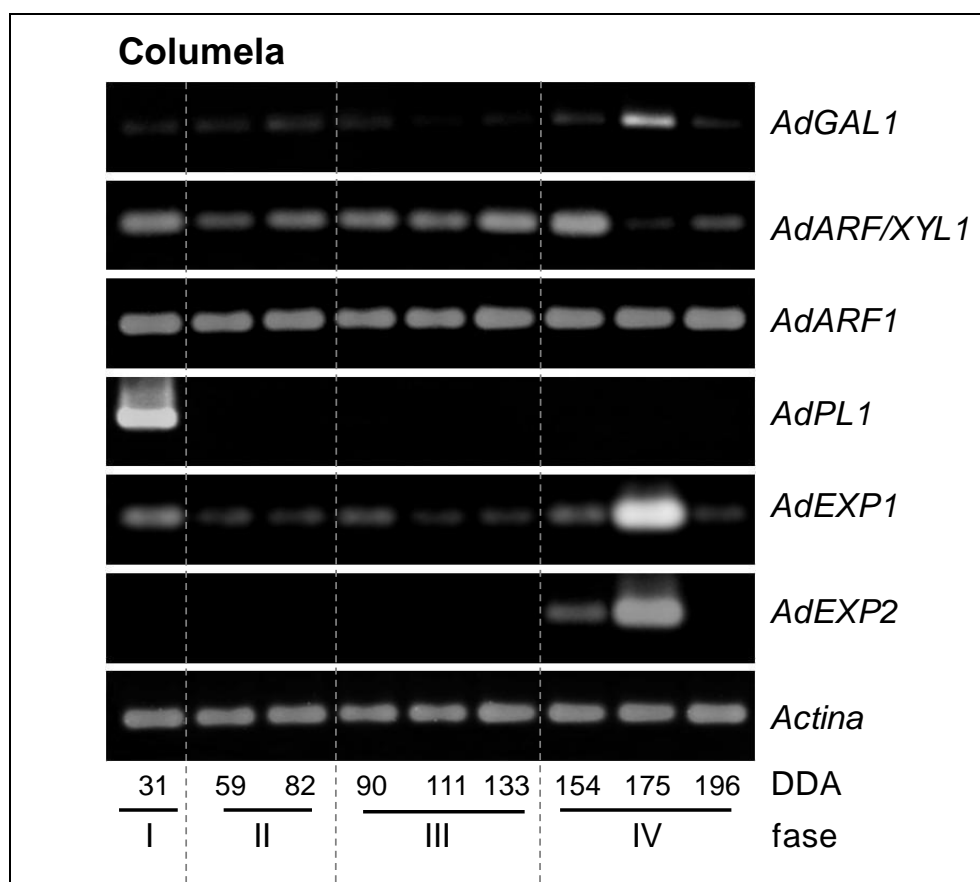


Figura 3.20 Expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en la columela durante el crecimiento y desarrollo del kiwi.

Los muestreos para las extracciones de ARNm se realizaron los días: 31, 59, 82, 90, 111, 133, 154, 175 y 196, y están indicados con números arábigos (DDA – días después de antesis). Las fases del desarrollo del fruto están marcadas con los números romanos. El gen de *Actina* se utilizó como un control interno para normalizar las cantidades del molde inicial.

La expresión del gen *AdPL1* fue alta en la Fase I, detectándose en los días 5, 17 y 31 en el mesocarpo (Figura 3.19) y solamente en el día 31 en la columela (Figura 3.20). No se evidenció expresión del dicho gen durante las fases posteriores hasta el día 175, cuando se registró una leve expresión en el mesocarpo (Fase IV, Estadio 1).

La acumulación de transcritos de *AdEXP1* se detectó tanto en el mesocarpo como en la columela, con expresión mayor en la Fase I y en la Fase IV respecto de las Fases II y III (Figuras 3.19 y 3.20). El gen *AdEXP2* siguió un patrón de expresión similar al de *AdEXP1*, con la excepción de que en la columela los transcritos de *AdEXP2* se registraron recién en la Fase IV (Figura 3.20).

3.6. Experimento 6: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en kiwis durante el período de postcosecha y su vinculación con los niveles de firmeza y de producción de etileno

Para estudiar la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante el período de postcosecha, los kiwis ‘Bruno’ se cosecharon en el Estado 2 de maduración y se almacenaron a 20 ± 2 °C. Se efectuó un seguimiento de cambios de la firmeza y de la producción de etileno de los frutos almacenados, realizando las mediciones los días 1, 5, 9, 16, 20 y 23 (Figura 3.21).

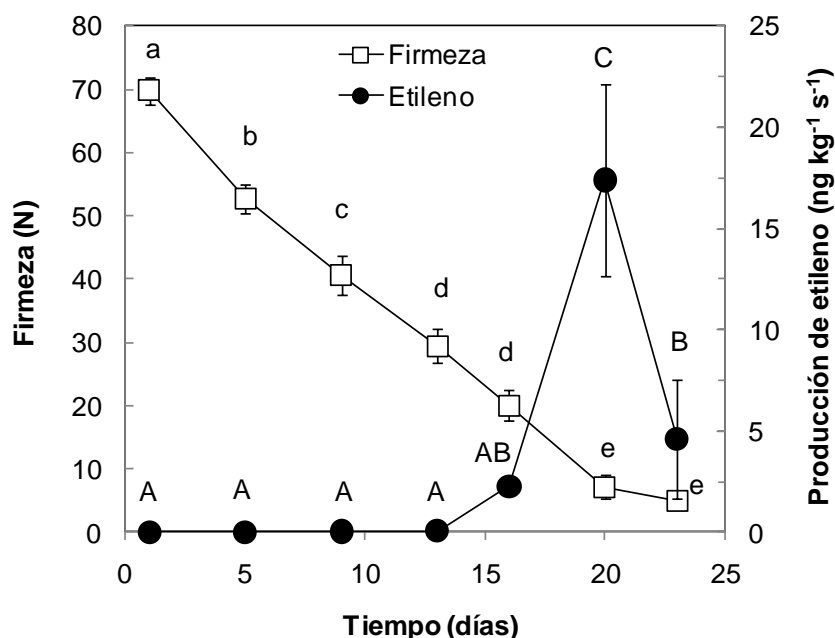


Figura 3.21 Variaciones de firmeza y de producción de etileno durante el período de almacenamiento de los frutos a 20 ± 2 °C después de cosecha en el Estado 2 de maduración.

Los valores representan las medias y las barras el error estándar. Cuando las barras no son visibles, el error no excede el tamaño del símbolo. Letras distintas representan las diferencias significativas entre distintos días para la firmeza (letras minúsculas) y para la producción de etileno (letras mayúsculas), de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Se detectaron pérdidas de firmeza, primero con una tasa elevada, de alrededor de $3,3 \text{ N d}^{-1}$ durante los primeros 15 d (Estado 2 de maduración), y luego con una tasa

reducida, de $1,5 \text{ N día}^{-1}$, durante los siguientes 10 d (Estadio 3 de maduración). No se detectó la producción del etileno durante los primeros 13 d de almacenamiento, lo que coincide con el comportamiento normal del kiwi. Recién en el día 16 se encontraron los primeros resultados positivos de producción del etileno endógeno, con el pico máximo en el día 20, y posterior disminución en el día 23 cuando los frutos se encontraban ya sobremaduros (Figura 3.21).

La expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* se analizó durante el período de postcosecha en el mesocarpio y en la columela de los frutos de kiwi (Figura 3.22).

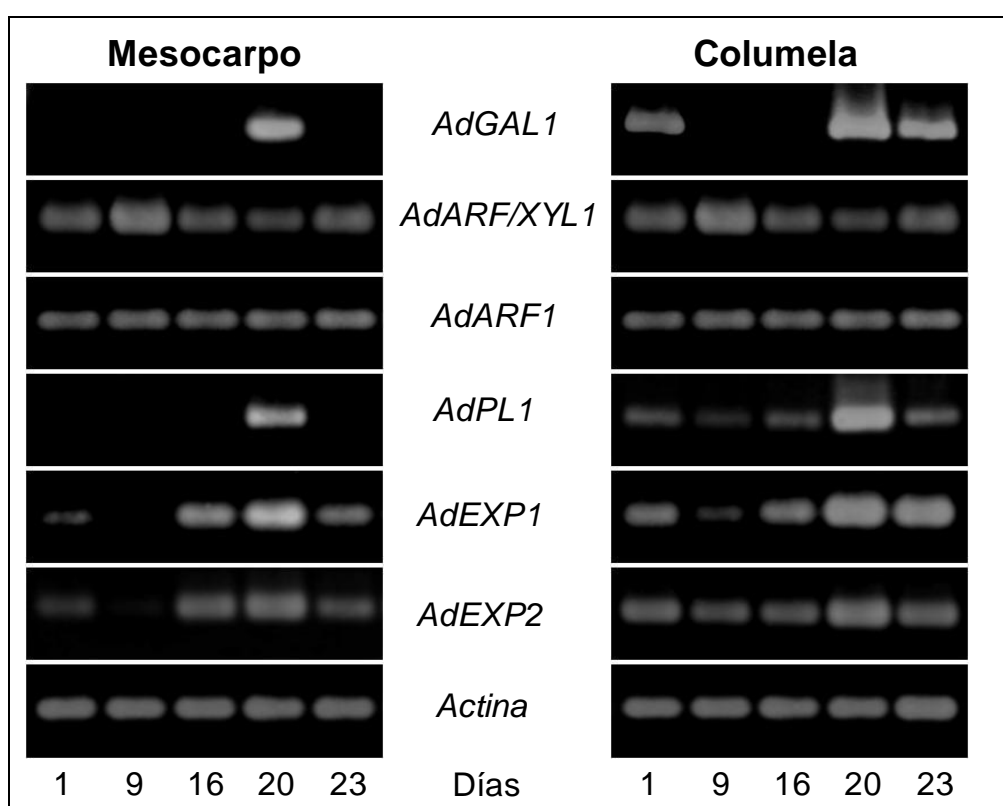


Figura 3.22 Expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en el mesocarpio y en la columela durante el período de almacenamiento de los frutos a $20 \pm 2 \text{ °C}$, después de su cosecha en el Estadio 2 de maduración.

El gen de *Actina* se utilizó como un control interno para normalizar las cantidades del molde inicial.

La acumulación de transcritos de *AdGAL1* se detectó en el mesocarpio recién en el día 20, lo que coincide con el pico de producción de etileno, mientras que en la

columela se registró la acumulación de transcriptos de *AdGAL1*, además del día 20, en los días 1 y 23 del ensayo (Figura 3.22).

La expresión del gen *AdARF1* no mostró variaciones de consideración en ambos tejidos durante todo el período del ensayo. En cambio, los niveles de expresión del gen *AdARF/XYL1* fueron más elevados en los días 1 y 9, disminuyendo en el día 23, tanto en el mesocarpio como en la columela (Figura 3.22).

La acumulación de transcriptos del gen *AdPL1*, tanto en el mesocarpio como en la columela, guarda cierta similitud con la expresión del gen *AdGAL1*, particularmente por la coincidencia del pico de expresión en el día 20 (Figura 3.22), aunque en la columela la expresión del gen *AdPL1* se extiende con menor intensidad a todos los momentos de muestreo.

La expresión de los genes *AdEXP1* y *AdEXP2* fue similar en el mesocarpio y en la columela. Exceptuando el día 9, se detectó un aumento de sus transcriptos hacia el día 20, con un máximo en esa fecha, y una disminución posterior hacia el día 23 (Figura 3.22).

3.7. Experimento 7: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en frutos tratados con etileno y con 1-MCP, y su vinculación con los niveles de firmeza

En las primeras 6 h del experimento no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 3.23). Sin embargo, el ablandamiento de los frutos tratados con etileno fue notablemente más rápido y en 48 h la firmeza disminuyó desde 33 N hasta 10 N (es decir, a la impresionante tasa de casi $0,5 \text{ N h}^{-1}$). Los frutos control se mantuvieron más firmes con respecto de los frutos tratados con etileno, pero siguieron un patrón de ablandamiento similar, y mostraron diferencias significativas recién a los 48 h.

El tratamiento con 1-MCP mantuvo la firmeza de los frutos durante el ensayo en un rango de valores de 33 a 28 N, mostrando diferencias significativas entre los frutos control y los frutos tratados con etileno, tanto a las 24 como a las 48 h (Figura 3.23).

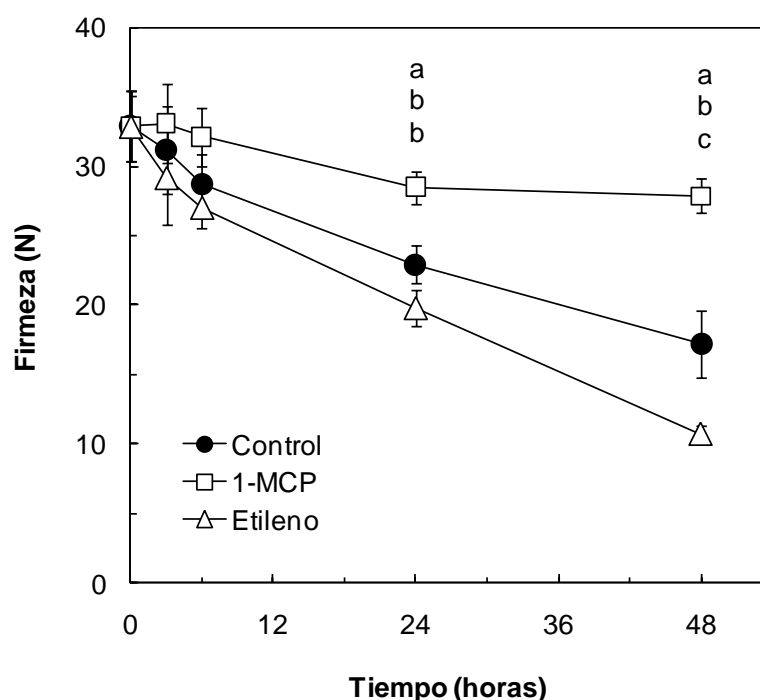


Figura 3.23 Efecto del etileno exógeno y del 1-MCP sobre la firmeza de los frutos.

Los frutos se trataron con etileno $10 \mu\text{L L}^{-1}$ y con 1-MCP $1 \mu\text{L L}^{-1}$, mientras que frutos no tratados se utilizaron como control. Los valores representan las medias y las barras el error estándar. Cuando las barras no son visibles, el error no excede el tamaño del símbolo. Letras distintas en una misma fecha representan diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

En los frutos tratados con etileno, los niveles de ARNm del gen *AdGAL1* aumentaron ligeramente en el término de 3 h, y drásticamente a las 6 h, decreciendo a las 48 h cuando el fruto alcanzó valores de firmeza de ~ 11 N (Figura 3.24). En cambio, no se detectó este aumento en la expresión del gen en los frutos controles y en los tratados con 1-MCP.

La acumulación de transcritos de *AdARF1* se produjo en niveles semejantes en los frutos control, en los frutos tratados con 1-MCP y en los tratados con etileno, excepto que en los frutos tratados con etileno la expresión del gen disminuyó a las 48 h. La expresión del gen *AdARF/XYL1* se detectó en los frutos de todos tratamientos, igual al gen *AdARF1* (Figura 3.24).

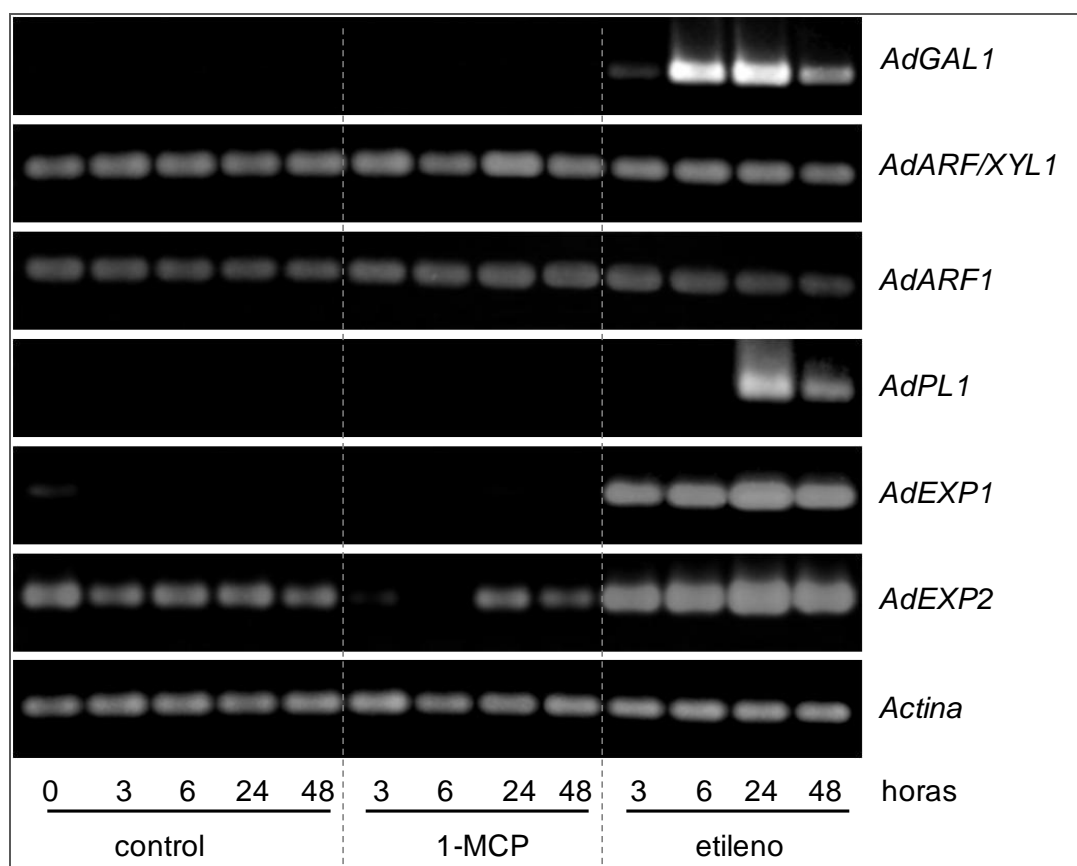


Figura 3.24 Efecto del etileno exógeno y del 1-MCP sobre la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en el mesocarpio de kiwi. Los números arábigos indican los momentos de los muestreos (en horas). El gen de *Actina* se utilizó como control interno para normalizar las cantidades del molde inicial.

En los frutos tratados con etileno, no se detectó acumulación de ARNm de *AdPL1* a las 3 y 6 h, aunque el nivel de expresión resultó manifiesto a las 24 h, disminuyendo a las 48 h (Figura 3.24). En cambio, no se observó expresión de dicho gen en frutos controles o en frutos tratados con 1-MCP durante el experimento.

3.8. Experimento 8: Evaluación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en órganos florales y tejidos vegetativos

La expresión del gen *AdGAL1* se detectó en ovarios, pero no en otros órganos florales como pétalos, sépalos, estambres y estilos. Asimismo, se verificó la acumulación de transcriptos en hojas jóvenes y en raíces de plántulas, lo que indica que

la expresión del gen no es específica de un solo órgano o tipo de órgano (vegetativo o reproductivo) (Figura 3.25).

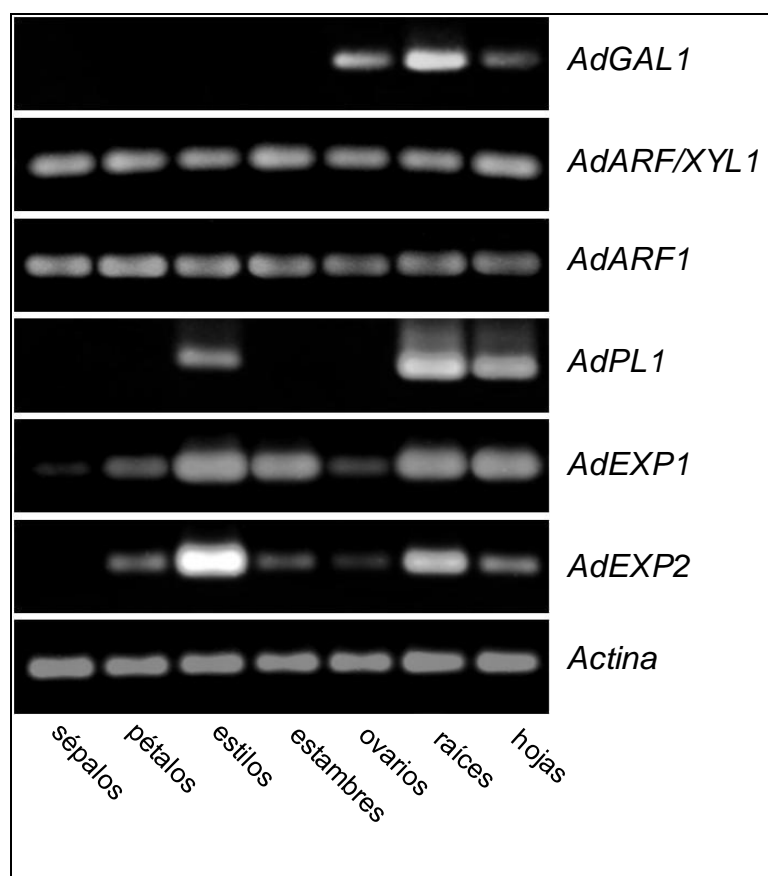


Figura 3.25 Variación de la expresión de los genes *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en órganos florales (sépalos, pétalos, estilos, estambres, ovarios), raíces y hojas jóvenes de plántulas.

El gen de *Actina* se utilizó como un control interno para normalizar las cantidades del molde inicial.

Los genes *AdARF1* y *AdARF/XYL1* se expresaron en todos los tejidos estudiados sin diferencias marcadas, mientras que la acumulación de transcritos del gen *AdPL1* fue registrada solo en raíces y hojas jóvenes. Ésto último también sucedió con el gen *AdGAL1*, pero además éste también se expresó en los estilos (Figura 3.25).

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1. Los resultados de la aplicación de 1-MCP en kiwi dependen fuertemente de las características de la región de origen de los frutos

Una miríada de factores de precosecha, tanto ambientales como de manejo, afecta el crecimiento, el desarrollo y la calidad final de los frutos en general, influyendo en su textura (Sams, 1999), en su sabor y aroma (Mattheis y Fellman, 1999) y en los desórdenes fisiológicos que los afectan en postcosecha (Ferguson et al., 1999). En kiwi, diversos trabajos señalan la influencia de los factores de precosecha en la calidad, tanto en referencia a las características de la región de cultivo (Okuse y Ryugo, 1981; Crisosto et al., 1984; MacRae et al., 1989) cuanto al sistema de cultivo en sí (Amodio et al., 2007). Entre las diferencias más notables registradas entre frutos provenientes de diferentes huertos se encuentran aquellas relacionadas con diferentes índices, tales como la concentración total de almidón, el patrón de cambio del almidón en la columela, la suma de los tres compuestos ácidos principales (cítrico, quínico y málico) y las relaciones azúcares/almidón y azúcares/ácidos (MacRae et al., 1989). Por lo tanto, es posible que buena parte de la variabilidad en la maduración que presentan los frutos luego de aplicarse los diferentes tratamientos de postcosecha se deba a la región/huerto de origen de los frutos y al sistema de manejo tecnológico usado. En el momento de la cosecha, los frutos de Baradero y de Mar del Sur tenían similares valores de firmeza y de sólidos solubles. Sin embargo, los frutos de Baradero (Figura 3.2, B) maduraron y se ablandaron más rápido que los frutos de Mar del Sur (Figura 3.1, B). La aplicación del etileno acortó la vida útil de los frutos de Baradero de forma más drástica que en los frutos de Mar del Sur (Figuras 3.1, B y 3.2, B). Cuando se aplicó el análisis estadístico para comparar la producción autocatalítica de etileno de los frutos provenientes de ambas regiones que fueron tratados con etileno, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), tanto en el momento de aparición del pico de etileno cuanto en su magnitud

(datos no mostrados). En efecto, los frutos de Baradero manifestaron un pico más temprano y una tasa máxima de producción de etileno más elevada (comparar Figuras 3.1, A y 3.2, A).

El 1-MCP inhibió la producción de etileno en los frutos de ambas localidades, pero el tratamiento fue menos efectivo en la prevención del ablandamiento de los frutos de Baradero, los cuales alcanzaron un estado apropiado para el consumo en el día 28 (Figura 3.2, B). El 1-MCP produjo un aplazamiento en el ablandamiento de los frutos de Mar del Sur, que alcanzaron al final del experimento un nivel de firmeza de 45 N y que, por lo tanto, no se encontraban aún aptos para el consumo (Figura 3.1, B). En ensayos previos, las aplicaciones de 1-MCP $0,5 \mu\text{L L}^{-1}$ disminuyeron notablemente la tasa de ablandamiento de los kiwis, que solamente mostraron una caída ligera de la firmeza de 85 a 61,3 N después de 25 d a 20 °C (Yin et al., 2008). También las condiciones de precosecha, como la temperatura e iluminación, pueden provocar diferencias de composición y, consecuentemente, modificaciones en la tasa de maduración y de ablandamiento, que podrían ser causas de respuestas variables por parte de los kiwis al 1-MCP, tal como se verificó en peras ‘Williams’ (Raffo et al., 2008). De hecho, los kiwis expuestos a la luz muestran niveles de firmeza de pulpa mayores que los que se desarrollan a la sombra (Tavarini et al., 2009).

Esta Tesis demuestra que la localidad de cultivo de la actinidia puede modificar la eficiencia del 1-MCP en el control de la acción del etileno en frutos ‘Hayward’ y que, por lo tanto, se pueden esperar distintas respuestas al 1-MCP durante el período de postcosecha. La sensibilidad al 1-MCP o a otras tecnologías de postcosecha puede variar según la ubicación del huerto, vinculándose con las características del suelo, las condiciones meteorológicas en la precosecha y/o las prácticas que determinan la constitución y la calidad de los frutos, producción del etileno y posterior capacidad de almacenamiento. Por lo tanto, el uso del 1-MCP y las condiciones de su aplicación en kiwi requieren de un ajuste tecnológico por localidad previo a su uso en escala.

En el caso del uso de 1-MCP inmediatamente después de la cosecha, como sustituto del frío, el ajuste del momento de aplicación según la región deberá considerar cuál es el destino que se desea asignar al kiwi (o sea, el tiempo de almacenamiento antes del consumo), ya que la aplicación de 1-MCP es capaz de modificar no sólo la tasa de ablandamiento, sino también las variaciones de otros índices, como el incremento de sólidos solubles, y la disminución de la acidez, del contenido de almidón y de amilosa,

que suelen acelerarse al percibir el fruto la presencia de etileno (Matsumoto et al., 1983).

4.2. El 1-MCP es un inhibidor capaz de retardar la pérdida de firmeza del kiwi, aún después de largos períodos de conservación en frío y en estados de ablandamiento avanzados

El kiwi muestra un comportamiento particular: (a) manifiesta un patrón climatérico de producción del etileno ostensible a 20 °C –que suele coincidir con el pico respiratorio (Pratt y Reid, 1974)–, pero no a temperaturas de 10 °C o inferiores (Antunes et al., 2000), aunque algunos autores ha detectado picos de producción de etileno de muy escasa magnitud (menores a 0,6 $\mu\text{L L}^{-1}$) en kiwis ‘Hayward’ a 0 °C transcurridos 90 d o más de exposición al frío (Chiaramonti y Barboni, 2010); (b) se ablanda en gran medida en ausencia de aumentos significativos en la producción autocatalítica de etileno, y el pico de síntesis del etileno a 20 °C se produce cuando los frutos ya han alcanzado o sobrepasado un nivel de firmeza apropiado para el consumo (Arpaia et al., 1994; Kim et al., 1999; Ritenour et al., 1999; Boquete et al., 2004; Yin et al., 2008; Figuras 3.1, 3.2, 3.4, 3.6-8); (c) es extremadamente sensible al etileno y concentraciones de este regulador de 0,1 $\mu\text{L L}^{-1}$ (McDonald y Harman, 1982) o incluso menores (Saltveit, 1999) son suficientes para inducir la maduración precoz y desencadenar un ablandamiento masivo del fruto, lo cual impediría su conservación o almacenamiento prolongados y una vida útil acorde con los requerimientos comerciales; (d) es capaz de percibir la presencia de etileno mucho antes del inicio de su síntesis autocatalítica (Whittaker et al., 1997; Antunes et al., 2000; Yin et al., 2008), aunque la capacidad para percibir el propileno –un compuesto análogo del etileno– parece disminuir con el avance de la maduración en *Actinidia chinensis* (Mworia et al., 2010); y (e) mantiene el alto grado de sensibilidad al etileno incluso a temperaturas bajas (Yin et al., 2009).

Entre las prácticas comerciales que disminuyen drásticamente la tasa respiratoria, la síntesis de etileno, la deshidratación y el ablandamiento del kiwi se encuentra, en primer término, el manejo adecuado de la temperatura, con un rango recomendado de 0-2 °C (Kader, 2002). Ninguna tecnología ha podido reemplazar las ventajas que otorgan las bajas temperaturas en la conservación del kiwi a mediano y largo plazo. Sin embargo, se considera que la aplicación de otras tecnologías puede

suplementar ventajosamente al uso de la refrigeración. El kiwi tiene una excelente capacidad de respuesta a las atmósferas controladas, que involucren O_2 1 kPa y CO_2 7 kPa (Mir y Beaudry, 2002), ya que pueden reducir tanto la tasa de ablandamiento cuanto la incidencia de ataque de *Botrytis cinerea*. No obstante, existe poco o ningún beneficio si el retraso en el establecimiento de las atmósferas controladas supera los 7-10 d. Además, la utilización de esta tecnología no es posible en todos los niveles de comercialización. Otras tecnologías alternativas, como la exposición de los kiwis a altas temperaturas (Antunes y Sfakiotakis, 2000) y a radiación UV-C (Bal y Kok, 2009) producen retrasos significativos en la pérdida de firmeza, pero son de difícil aplicación a nivel operativo en plantas de empaque de kiwi. De allí proviene la búsqueda de tecnologías alternativas, tales como la aplicación de 1-MCP, en orden a la reducción de las pérdidas cualitativas y cuantitativas durante la conservación a bajas temperaturas y el posterior almacenamiento a temperatura ambiente hasta su venta.

Koukounaras y Sfakiotakis (2007) demostraron que la aplicación del 1-MCP antes del almacenamiento en frío retrasa el ablandamiento hasta 14 d durante la vida útil del fruto a 20 °C, *a posteriori* de un almacenamiento en frío de duración corta (4 semanas) o mediana (10 semanas). Por otra parte, los kiwis cosechados y tratados con 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ durante 20 h a 20 °C, y luego almacenados durante 3 meses a 0 °C, mostraron una mejor conservación, aunque el efecto se perdió al trozarse (Antunes et al., 2010). Boquete et al. (2004) brindaron evidencia de que los frutos tratados a 0 °C con 1-MCP 0,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ después de 30 d de conservación en frío y luego transferidos a 20 °C, se ablandan a una tasa menor durante el almacenamiento posterior a 20 °C que los frutos no tratados. Sin embargo, el período de tiempo en que los kiwis pueden ser conservados a bajas temperaturas y todavía responder satisfactoriamente al 1-MCP no era clara, ya que otros trabajos señalaban la ausencia del respuesta de los frutos al 1-MCP luego de un período de conservación a 0 °C (Kim et al., 2001).

En este trabajo de Tesis se demostró que el 1-MCP, aplicado inmediatamente antes de la salida de los frutos de un período de conservación en frío (0 °C) corto (40 d), mediano (80 d) o largo (120 d) resulta efectivo para retrasar el ablandamiento, aunque la eficiencia del 1-MCP en el retardo de la pérdida de la firmeza disminuye con el aumento de la duración del período de conservación en frío. Sin embargo, el 1-MCP puede resultar un muy buen complemento de las bajas temperaturas, dado que tiene la capacidad de extender la vida útil del kiwi dentro de los límites de aceptación por parte

del consumidor. Por ejemplo, los kiwis expuestos a 80 d de frío (0 °C) y posteriormente tratados con 1-MCP antes de ser transferidos a 20 °C, se ablandaron gradualmente y estuvieron “listos para su consumo” durante 28 d de vida útil del fruto (Figura 3.6, B). Existen evidencias adicionales que sostienen el hecho de que la supresión de la percepción del etileno retrasa el progreso del ablandamiento en kiwis “Hayward” en diferentes estadios de la maduración. La exposición de kiwis recién trozados (mínimamente procesados) parcialmente maduros (15-20 N) a 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ durante 6 h a 10 °C produjo un descenso efectivo en su tasa de ablandamiento durante su conservación posterior de 7 d a 5 °C, ya fuera que el 1-MCP se aplicara antes o después del procesamiento (Vilas-Boas y Kader, 2007). Los kiwis demuestran una buena respuesta al 1-MCP, aún en etapas avanzadas de ablandamiento, bajo condiciones de frío (Boquete et al., 2004; Koukounaras y Sfakiotakis, 2007; Vilas-Boas y Kader, 2007). Sin embargo, en experimentos desarrollados en otros laboratorios, el 1-MCP también fue aplicado luego de un período prolongado de conservación en frío y posterior extracción a 20 °C, sin resultados positivos (Kim et al., 2001). En esta Tesis, los kiwis se conservaron durante un período corto (40 d), mediano (80 d) o largo (120 d) en frío, aplicándose el 1-MCP antes de pasar los frutos a 20 °C para su posterior ablandamiento. Esta modificación en la metodología puede explicar las diferencias entre los resultados obtenidos en esta Tesis y los de Kim et al. (2001), ya que la aplicación del 1-MCP a 20 °C propuesta por Kim et al. (2001) posibilitaría un avance sustantivo en el proceso de ablandamiento antes de que el 1-MCP pudiese bloquear los receptores del etileno. La justificación precedente resulta respaldada por los recientes resultados de Mworio et al. (2010), quienes observaron que el inicio de la síntesis autocatalítica de etileno inducido por propileno en *Actinidia chinensis* no resulta inhibido por 1-MCP 1 $\mu\text{L L}^{-1}$, requiriéndose dosis de 5-100 $\mu\text{L L}^{-1}$ para reducir en forma efectiva la síntesis de etileno en los días sucesivos. Alternativamente, el grado de la respuesta al 1-MCP también puede variar según las características del lugar de origen de fruto, tal como se trató en la sección anterior. Como bien señalan diferentes autores, el kiwi puede almacenarse a 0 °C por hasta 4-6 meses (Lurie, 2002; Ferguson, 2008), sin aplicación de otras tecnologías complementarias que no sean las que evitan la contaminación de etileno. En el caso de esta Tesis, luego de 80-120 días de almacenamiento, los valores de firmeza de los kiwis del ensayo se encontraron por debajo de los límites aceptables para transporte (>50 N) y comercialización (>30 N), aunque no por debajo de límites aceptables para el consumo. Esto podría atribuirse a una hipotética contaminación con

etileno o a situaciones de precosecha que predispongan a una tasa de ablandamiento más elevada (por ejemplo, excesivas precipitaciones). Contrariamente a resultar censurable, esto facilitó la corroboración de la Hipótesis 1, al asegurar que el 1-MCP es capaz de disminuir la tasa de ablandamiento, aún con niveles de firmeza tan bajos (<15 N). De allí que las conclusiones sobre la utilidad del 1-MCP en kiwis con niveles de firmeza apropiados para el transporte o comercialización también resulten sólidas.

Las condiciones de aplicación del 1-MCP limitan frecuentemente la eficiencia del tratamiento. El 1-MCP suele ser más efectivo cuando se aplica a frutos a temperatura ambiente que a bajas temperaturas y, por lo tanto, comenzó por aplicarse a 20-25 °C en la mayoría de los experimentos efectuados en laboratorio (revisado por Sozzi y Beaudry, 2007). Sin embargo, esto se considera muy poco práctico a nivel comercial, ya que los frutos requieren ser ubicados lo antes posible en condiciones térmicas óptimas para su conservación. Así, las cajas u otros envases conteniendo los frutos comienzan a enfriarse al tiempo que se llenan las cámaras frigoríficas –operación que demanda varios días–, antes de que el tratamiento con 1-MCP pueda tener lugar. Por esa razón, las investigaciones más recientes tienen en consideración estos requerimientos y los ensayos son realizados utilizando frutos refrigerados. Sólo los frutos de algunas especies muestran respuestas satisfactorias al 1-MCP a 0 °C, entre ellos las manzanas (Watkins y Nock, 2005), las paltas (Woolf, 2005), las peras europeas (Calvo y Sozzi, 2004), los kakis (Salvador et al., 2004), las ciruelas europeas (Lippert y Blanke, 2004) y japonesas (Menniti et al., 2006), y las granadas (Defilippi et al., 2006). El trabajo de Boquete et al. (2004) y los resultados de esta Tesis demuestran sin dudas que el kiwi se cuenta entre los frutos que responden favorablemente al 1-MCP a 0 °C.

Por otra parte, los frutos climatéricos cosechados tardíamente suelen mostrar una respuesta menor y, a menudo, una ausencia de respuesta al 1-MCP. Tales son los casos de las manzanas (Watkins et al., 2000; Mir et al., 2001), los damascos (Fan et al., 2000), las bananas (Harris et al., 2000), los kakis (Kurahashi et al., 2005; Salvador et al., 2006) y las ciruelas (Valero et al., 2003). Asimismo, si el fruto climatérico madura separado de la planta, el 1-MCP se torna inefectivo en la mayoría de los casos al aplicarse en postcosecha en estados de maduración relativamente avanzados. El tomate constituye un ejemplo en contrario ya que el 1-MCP es capaz de disminuir la tasa de ablandamiento del fruto en diferentes estados de maduración (Hoeberichts et al., 2002), y la aplicación de este regulador es capaz de extender la vida en postcosecha del fruto,

aún siendo aplicado cuando el fruto alcanzó el estado maduro (Wills y Ku, 2002). Otro modelo bien estudiado es el de las peras ‘Bartlett’, cuyo ablandamiento no se ve afectado por la aplicación de 1-MCP si los frutos se cosecharon con 58 N o menos (Villalobos-Acuña y Mitcham, 2008), o si se aplica 1-MCP luego de más de 3 semanas de exposición a 0 °C (Trinchero et al., 2004). En esta Tesis se puso en evidencia que el kiwi resulta un caso excepcional, por cuanto es capaz de responder a la exposición al 1-MCP, aún transcurridos largos períodos (4 meses) de exposición al frío.

Los consumidores realizan su primera compra de kiwis según su apariencia (ausencia de deshidratación y de ataque de agentes patógenos) y su firmeza al tacto. Sin embargo, la satisfacción del consumidor y la reiteración de la compra de este producto dependen de su sabor, que se valora mayormente a través de la concentración de los sólidos solubles y de la relación entre los sólidos solubles y la acidez titulable (Crisosto y Crisosto, 2001). Por el contrario, los productores, acopiadores y mayoristas tienen como prioridad el almacenamiento prolongado y la vida útil, junto con la apariencia y con otros signos de calidad. De hecho, las operaciones de clasificación, embalaje, transporte y almacenamiento requieren cierto grado de resistencia por parte del kiwi para evitar los daños mecánicos. El umbral de 18 N es la firmeza mínima requerida para evitar los daños físicos durante la manipulación después de la cosecha, cuando los frutos son transportados a los mercados (Crisosto et al., 1997). Los kiwis con firmeza entre 13 y 18 N se consideran “listos para la compra”, lo cual es percibido por el comprador ya que los frutos comienzan a ceder a la presión al tacto. Finalmente, los frutos con firmeza entre 4 y 13 N se consideran usualmente “listos para el consumo” según diferentes criterios de firmeza establecidos anteriormente (Stec et al., 1989; Crisosto y Crisosto, 2001) aunque los frutos ubicados en el rango de 8-10 N pueden ser considerados óptimos para la aceptación por parte del consumidor. El desarrollo de nuevos protocolos de conservación de los kiwis después de su cosecha debería enfocarse tanto en la importancia del retraso del ablandamiento y la prolongación de la vida de los frutos después de la cosecha, como en la garantía de un buen sabor y textura, que son razones primarias de conformidad por parte del consumidor. Dado que el kiwi continúa incrementado su contenido en sólidos solubles y azúcares reductores durante la conservación a 0 °C (Manolopoulou y Papadopoulou, 1998), una interrupción prematura de la maduración por aplicación de 1-MCP podría afectar los valores finales de estos índices, tan importantes para la aceptación del producto por parte del

consumidor. La aplicación tardía del 1-MCP, inmediatamente antes de la salida de la cámara de frío –tal la propuesta original de esta Tesis– permite el retardo de la etapa final del ablandamiento, etapa a la que se arriba cuando el fruto ya ha sobrepasado los niveles mínimos de sólidos solubles que aseguran su calidad (Crisosto y Crisosto, 2001).

4.3. El 1-MCP produce un bloqueo en la expresión de los genes *KWACSI* y *KWACOI* de kiwi

Los kiwis ‘Hayward’ sin tratamiento alguno muestran un típico comportamiento climatérico al ser almacenados a 20 °C en aire libre de etileno o propileno, con un inicio de la síntesis autocatalítica de etileno aproximadamente 19 d después de la cosecha (Arpaia et al., 1994; Antunes et al., 2000) aunque el tiempo del inicio puede depender de la localización del huerto (Figura 3.1 y 3.2, A). Los frutos control de Mar del Sur, colocados a 20 °C, llegaron a la producción máxima de etileno en el día 24 después de cosecha (Figura 3.1, B), con la expresión concurrente de los genes *KWACSI* y *KWACOI*, tanto en el mesocarpo externo como en la columela (Figura 3.3).

Los trabajos previos mostraron un incremento en la acumulación de transcritos de *KWACSI* y *KWACOI* durante la maduración del kiwi (Whittaker et al., 1997; Xu et al., 2000). En esta Tesis, el momento de la transcripción de *KWACSI* y *KWACOI* correlacionó con el correspondiente pico de producción de etileno, tanto en los frutos control como en los frutos tratados con etileno (Figura 3.1, A y 3.3). La asociación de la expresión de los genes con la producción del etileno fue confirmada mediante los tratamientos con 1-MCP. La acumulación de los transcritos de *KWACSI* y *KWACOI* fue totalmente inhibida por el 1-MCP (Figura 3.3), tanto en el mesocarpo externo como en la columela y, en correspondencia, la producción de etileno a 20 °C fue prácticamente nula durante todo el período del experimento (Figura 3.1, A). Estos resultados conciden con los obtenidos por Yin et al. (2008) quienes no detectaron producción del etileno en los frutos tratados con 1-MCP, aún después de 25 d. Mientras que el etileno exógeno incrementa y el 1-MCP claramente inhibe la transcripción de los genes *KWACSI* y *KWACOI* en kiwi, independientemente del tejido considerado, la expresión del gen *KWACS2* no mostró una clara respuesta al etileno y al 1-MCP (Figuras 3.3, 3.5 y 3.9). En tomates en estado virado y rosado tratados con 1-MCP, la

reducción en la producción de etileno fue acompañada en gran medida por la inhibición de la acumulación de transcriptos de los genes *LE-ACS2*, *LE-ACS4*, *LE-ACO1* y *LE-ACO4*, en tanto que otros varios genes codificantes de ACS no fueron afectados (Nakatsuka et al., 1998).

La exposición de los kiwis a la temperatura óptima de conservación (0 °C) durante 40, 80 o 120 d produjo, desde el momento de transferencia de los frutos a 20 °C, un adelanto del pico de producción de etileno y una aceleración del ablandamiento (Figuras 3.4, 3.6 y 3.7, A y B) en comparación con los frutos almacenados únicamente a 20 °C luego de la cosecha (Figuras 3.1, A y B). Antunes y Sfakiotakis (2002) encontraron que este adelanto de la producción del etileno en kiwis es debido al aumento de la actividad de las enzimas ACO y ACS al retornar el fruto a temperatura ambiente. Nuestros resultados indicaron que la exposición de los frutos a 0 °C durante 40 d adelanta posteriormente el pico de producción de etileno (día 18 a 20 °C), con el aumento concomitante de la acumulación de transcriptos de *KWACSI* en el mesocarpio externo (días 15 y 18) y en la columela (días 18 y 22), y del gen *KWACO* en ambos tejidos en el día 18 (Figura 3.5). Además, esta Tesis demuestra que el 1-MCP inhibe totalmente o disminuye drásticamente la producción de etileno durante la vida útil de los kiwis almacenados a 20 °C, siempre y cuando se aplique inmediatamente antes de la salida de cámara fría a 0 °C (Figuras 3.4, 3.6 y 3.7, A). La exposición a condiciones de frío durante 40 d no disminuyó la eficacia del 1-MCP de inhibir la acumulación de transcriptos de *KWACSI* y *KWACO1* durante el tiempo de desarrollo del ensayo.

Los resultados de esta Tesis referidos a la inhibición de la acumulación de ARNm de *KWACSI* y *KWACO1* por el 1-MCP en *Actinidia deliciosa* ‘Hayward’ sugieren la existencia de una regulación positiva de la producción del etileno, en concordancia con el supuesto de que la biosíntesis de etileno y la expresión de los genes asociados a este proceso están bajo la regulación del Sistema 2 caracterizado por una retroalimentación positiva (Whittaker et al., 1997; Xu et al., 1998). Del mismo modo, Mworio et al. (2010) observaron en *Actinidia chinensis* ‘Sanuki Gold’ la inhibición por 1-MCP de la expresión de *AC-ACSI*, *AC-ACO1* y *AC-ACO2* en frutos previamente inducidos por presencia de propileno. Por otra parte, la expresión del gen *KWACS2* no demostró una respuesta clara al 1-MCP. En los frutos de muchas especies, entre ellas el tomate, las actividades de ACS y ACO demostraron estar relacionadas con los niveles de transcripción de familias multigénicas, cuyos miembros son regulados

diferencialmente (Nakatsuka et al., 1998). Este podría ser el caso del fruto de *Actinidia deliciosa*, en el cual se expresan al menos dos genes codificantes de ACS (esta Tesis), y de *Actinidia chinensis*, donde se detectó la expresión de al menos dos genes codificantes de ACO (Mworia et al., 2010).

Los datos publicados recientemente sobre genes asociados con la ruta de señalización del etileno en kiwi probaron la existencia de una serie de cambios de la expresión génica durante la maduración y en respuesta a la exposición al 1-MCP (Yin et al., 2008) y al frío (Yin et al., 2009). El 1-MCP tiene otros efectos además de bloquear fuertemente los incrementos en los niveles de transcritos de *KWACS1* y *KWACO1*, ya que es capaz de inhibir la respuesta al etileno de ciertos componentes de la ruta de transducción de señales del etileno. Según Yin et al (2008), solamente los niveles de transcritos de *AdETR2* y *AdCTR1* son transitoriamente regulados de forma negativa por el 1-MCP en tanto que, llamativamente, este inhibidor de la acción del etileno no tiene efecto alguno sobre la expresión de los genes codificantes de receptores en la columela. *AdERS1b*, identificado por Yin et al. (2008) como un gen codificante de un receptor posiblemente relacionado con el ablandamiento del kiwi, no demuestra una respuesta al etileno y mantiene niveles de expresión relativamente altos en los frutos tratados con 1-MCP, por lo cual podría interpretarse como un gen cuya expresión se vincula al ablandamiento de forma independiente a la percepción del etileno. Por otra parte, la expresión de la mayoría de los *AdERFs* resultó ser mayor durante el desarrollo temprano del fruto, con excepción de la de *AdERF3*, que se incrementó durante la maduración. Varios *AdERFs* podrían ser regulados por el etileno, ya que el tratamiento con 1-MCP inhibió sustancialmente los incrementos en los niveles de transcritos de *AdERF4*, *AdERF6*, *AdERF10* y *AdERF14* hacia el final del período de maduración, y también inhibió la disminución en *AdERF3* y *AdERF13* (Yin et al., 2010). La supresión de la síntesis de ACO mediante técnicas antisentido ratificó los resultados obtenidos mediante el uso de 1-MCP (Yin et al., 2010). *AdEIL2*, *AdEIL3* y *AdEIL4* también mostraron respuestas al etileno, en diferentes grados. *AdEIL2* y *AdEIL3* actuaron como activadores induciendo los promotores de *AdACO1* y *AdXET5* (Yin et al., 2010), éste último codificante de la enzima xiloglucano endotransglicosilasa. Es evidente que el 1-MCP es capaz de actuar a diferentes niveles de la cascada de señales que inhibe a posteriori la transcripción de *KWACS1* y *KWACO1* (Figuras 3.3, 3.5 y 3.9), aunque aún

no se haya dilucidado cuál/es es/son el/los punto/s críticos cuyo bloqueo por parte del 1-MCP justifica su efectividad sorprendente a nivel tecnológico.

4.4. Análisis de secuencia in silico del gen *AdGAL1*

En esta Tesis se obtuvo una secuencia completa ADNc codificante de β -Gal de un fruto maduro mediante la técnica de RT-PCR y fue designada *AdGAL1* (Número de acceso del GenBank: HQ108111). El análisis de la secuencia de nucleótidos mediante Blast demostró homología de *AdGAL1* con β -Gal de otros frutos: 79% con el clon *SP26* de mango (AF004812), 78% con el clon *TBG4* de tomate (AF020390), 77% con el clon *PpGAL1* de *Pyrus pyrifolia* (AB046543), 76% con el clon *PpGAL4* de *Pyrus pyrifolia* (AB190365), 75% con el clon *pBG(a)* de *Carica papaya* (FJ859031), con una cobertura en el rango entre 84 y 96%.

El programa NCBI ORF Finder predijo que la secuencia de *AdGAL1* codifica una proteína de 728 aminoácidos. El programa SignalP predijo la presencia del péptido señal en N terminal, con el sitio de clivaje entre los restos 27 y 28. *AdGAL1* contiene el sitio activo y un dominio conservado de la familia 35 de glicosil hidrolasas, que se superpone con el dominio de la superfamilia 42 de glicosil hidrolasas. El ‘valor e’ (‘expectation value’) del dominio correspondiente a la familia 35 es sumamente bajo (1.00×10^{-190}) y, por lo tanto, su resultado es altamente significativo (programa SMART). La proteína madura posee un PM de 81,12 kDa y un pI teórico de 7,5, según la predicción del programa PeptideMass. El PM predicho (81 kDa) no coincide exactamente con el PM de ninguna de las formas de β -Gal obtenidas de kiwi, purificadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, o por separación por tamiz molecular, en un trabajo anterior (Ross et al., 1993). El pI es similar al de una de las formas minoritarias de β -Gal. Existen diversas explicaciones posibles, entre ellas, la existencia de diversas isoformas de la misma enzima, dificultades técnicas para la extracción, purificación y determinación de la enzima cuyo gen se clonó en esta Tesis, cierto margen de inexactitud de los métodos de determinación de PM y de pI de las proteínas, posibles bloqueos a nivel de traducción o activación de la enzima en el estado del fruto en que fue extraída, inactivación de la enzima in vitro pero no in vivo, etc.

El programa SMART demostró que *AdGAL1* tiene un sitio activo de la secuencia consenso de la familia de glicosil hidrolasas 35: G-G-P-[LIVM](2)-x(2)-Q-x-E-N-E-

[FY], donde X es cualquier aminoácido, [LIVM] y [FY] son componentes conservados (Figuras 3.10; Henrissat, 1998). La presencia de este dominio conservado se encuentra tanto en procariotas como en eucariotas. En las plantas superiores fue detectado en β -Gal de *Arabidopsis* (Gantulga et al., 2009), tomate (Smith y Gross, 2000), palta (Tateishi et al., 2007) y naranja (Wu y Burns, 2004).

4.5. La expresión génica de *AdGAL1*, *AdARF/XYL1*, *AdARF1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante la ontogenia del kiwi puede vincularse con los cambios que se producen en la pared celular

El desarrollo del fruto, medido en términos de acumulación de peso fresco (Figura 3.17) manifestó un patrón similar al de una curva sigmoidea doble, en concordancia con mediciones anteriores (Sozzi, 2007a), aunque con una Fase I de división y expansión celular inicial mucho más breve y una Fase II de crecimiento reducido de mayor duración, lo que condicionó en parte el peso final de los frutos. Esto probablemente se deba a las diferencias en las condiciones meteorológicas imperantes. En efecto, las mediciones de esta Tesis se efectuaron en condiciones de déficit hídrico moderado, en el marco de un verano cálido, mientras que no se produjo déficit hídrico en la campaña 2004-2005 informada previamente (Sozzi, 2007a). Existe evidencia de que las condiciones de déficit hídrico, acompañadas por veranos cálidos y otoños fríos, favorecen ciclos de crecimiento de los kiwis más breves y una maduración más temprana de los mismos, en comparación con situaciones de buena dotación hídrica y condiciones cálidas durante todo el ciclo (Salinger et al., 1993). Este hecho resulta importante por cuanto el tiempo, medido como el número de días después de antesis, en que se produce la acumulación de transcritos de cada gen objeto de estudio no ha de considerarse en forma absoluta, sino más bien en vinculación con la fase del crecimiento en que se registra.

Las paredes celulares son compartimentos complejos y dinámicos que constituyen la base de las propiedades sensoriales de un fruto (no sólo de la firmeza, sino también del sabor y aroma), y el sostén de diversos procesos metabólicos del desarrollo celular, y del crecimiento y senescencia de los órganos. En el marco del estudio de las paredes celulares y sus cambios relacionados con los mecanismos de ablandamiento de los frutos, se conocieron muchos de los polisacáridos componentes de

la pared celular y, al mismo tiempo, se elaboraron y refinaron modelos esquemáticos de su estructura que pudieran explicar cómo los polímeros de las paredes celulares se vinculan entre sí para generar las propiedades texturales que caracterizan a los frutos en cada etapa. Sin embargo, estos modelos son –hasta nuestros días– genéricos, y su objetivo –por cierto excesivamente amplio y general– no es otro que comprender “la pared celular vegetal”, como si cualquiera de los modelos fuese aplicable a las paredes celulares de todas las especies y órganos. Resulta cada vez más evidente: (1) que los polisacáridos que componen las paredes celulares son muy diversos en términos de sus estructuras; (2) que esas estructuras están reguladas por el desarrollo; (3) que las paredes celulares de un órgano no están compuestas por las mismas configuraciones de polisacáridos y que, a menudo, existen diferentes topologías dentro de la pared celular de una misma célula; (4) que los genes codificantes de enzimas de la pared celular suelen manifestarse como familias, cuyos miembros: a) presentan habitualmente regulaciones variadas según la especie, b) dan lugar a fenómenos de redundancia funcional, o c) codifican para enzimas con diferentes sustratos como blancos de ataque y distintos tiempos ontogénicos de actividad y; (5) que la presencia de las enzimas activas no asegura su acceso a sus sustratos específicos, o siquiera la existencia de un sustrato específico (ver revisiones generales de Sozzi, 2004; Harris, 2005; Vicente et al., 2007; Bennett y Labavitch, 2008; Goulao y Oliveira, 2008; Knox, 2008; ver además trabajos particulares recientes de Verhertbruggen et al., 2009; Li et al., 2010; Marcus et al., 2010). Los análisis bioquímicos, la clonación de genes y el estudio de su expresión en cada especie y órgano individual constituyen caminos trabajosos pero eficientes para obtener información sobre las –a menudo– “familias” de genes involucradas en la modificación de los componentes de la pared celular de cada órgano y especie.

En esta Tesis se evaluaron por primera vez las expresiones de genes putativamente codificantes de β -Gal, α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y dos EXP en kiwi, tanto en mesocarpo externo como en columela a lo largo de toda la ontogenia de los frutos. Si bien las expresiones de cada uno de los genes estudiados tuvieron cierta similitud en mesocarpo externo y en columela, mostraron también diferencias de interés entre tejidos.

4.5.1. Expresión de *AdGAL1* durante la ontogenia

La maduración de muchos frutos está frecuentemente acompañada por la solubilización de los polisacáridos pécticos de la pared celular primaria y por la pérdida de galactosa de las cadenas laterales de los polímeros (Brummell, 2006). Los dos procesos suelen ocurrir en forma simultánea durante el ablandamiento, pero no es seguro que la remoción de los restos de galactosa de las cadenas laterales de los polisacáridos pécticos sea imprescindible para su solubilización en todos los frutos. En el kiwi, se registran varios hechos particulares al respecto:

1) La galactosa es el azúcar neutro predominante en la pared celular (Redgwell et al., 1997b). La síntesis e incorporación de nuevos componentes a la pared celular se produce durante toda la ontogenia del kiwi; sin embargo, si bien las modificaciones en la pared celular involucran claramente procesos de síntesis durante los tres primeros meses, se detectan pérdidas manifiestas de galactosa en los meses subsiguientes (Gallego y Zarra, 1997), lo cual implica que algunos polisacáridos ricos en galactosa pueden jugar un papel importante durante la etapa final del crecimiento. Esta hipótesis es refrendada por la verificación de actividad de β -Gal en esas fases relativamente tempranas (Ogawa et al., 1990). Por su parte, Li et al. (2006) señala pérdidas netas de arabinosa en las semanas 8 a 12 después de antesis.

2) Una importante solubilización de poliurónidos se detecta un mes antes de la fecha de cosecha comercial, es decir, aproximadamente en el quinto mes desde antesis, mostrando que un nuevo proceso de degradación se inicia en esa instancia, involucrando a polisacáridos ricos en ácidos urónicos (Gallego y Zarra, 1997).

3) Varios estudios sostienen que la mayor parte de la pérdida de galactosa se produce durante la maduración, aunque antecede a la solubilización de las pectinas (Redgwell y Percy, 1992; Redgwell y Harker, 1995), y que probablemente se deba a un sistema enzimático del tipo *exo*- β -Gal (Ross et al., 1993).

4) Llamativamente, la actividad de una β -Gal ya purificada (Ross et al., 1993) resulta mucho menor que la estimada como necesaria para que la liberación verificada de galactosa. Por otra parte, la actividad de β -Gal permanece constante durante el período de mayor liberación de galactosa (que según algunos trabajos, coincidiría con el Estadio 2 de maduración/ablandamiento), en tanto que la actividad se incrementa tardíamente en el Estadio 3 de maduración/ablandamiento (Wegrzyn y MacRae, 1992;

Bonghi et al., 1996). Por otra parte, la actividad de β -Gal decrece significativamente en frutos cosechados tempranamente (Tavarini et al., 2009).

Esta Tesis demuestra la existencia de una acumulación muy ligera de transcritos correspondientes al gen *AdGAL1* en los días 59 y 82 después de antesis (Fase II e inicio de la Fase III, Figura 3.19), en una etapa de crecimiento que –según los resultados de Li et al. (2006)– prácticamente coincide con un período caracterizado por una disminución marcada de galactosa (8-12 semanas después de antesis). Esto podría vincularse con un metabolismo de movilización y síntesis de novo de polisacáridos, más que con una degradación neta de la pared celular, ya que ese período es seguido por otro (16-20 semanas después de antesis) en que el contenido de galactosa en la pared celular se incrementa (Li et al., 2006). Sin embargo, la expresión de *AdGAL1* en la columela se observa en niveles reducidos durante las Fases I, II y III, y prácticamente nulos en el día 111 (Figura 3.20).

Por mucho, la mayor expresión de *AdGAL1*, tanto en el mesocarpo externo como en la columela, se verifica en el día 175 (Fase IV, Estadio 1 de maduración; Figuras 3.19, 3.20), cuando el fruto ha alcanzado estadísticamente su peso fresco máximo, iniciando la primera etapa de ablandamiento lento. Esto significa que la mayor acumulación de transcritos de este gen en kiwi unido a la planta es un hecho temprano en términos del proceso de pérdida de firmeza. Como se discutirá con mayor amplitud más adelante, los niveles de expresión más elevados de *AdGAL1* se registran en el estadio final del ablandamiento, tanto en mesocarpo externo como en columela, y en relación con la aplicación o la síntesis de etileno (Figuras 3.22, 3.24).

En general, no resulta fácil elucidar cuál es el blanco exacto en la pared celular de la actividad resultante de la expresión de un gen. Por ejemplo, la supresión de la expresión de *TBG4* de tomate –codificante de la enzima β -Gal II– mediante técnicas antisentido confirmó un papel para este gen en el ablandamiento, aunque el sustrato in vivo correspondiente a la enzima codificada por *TBG4* no se conoce (Smith et al., 2002). En el caso del kiwi y dada su complejidad, ni siquiera son totalmente coincidentes los resultados obtenidos hasta el presente por otros autores sobre la composición y cambios de la pared celular. Según Redgwell et al. (1997b), el 94% de la pérdida de galactosa de la pared celular del kiwi se produce en la fracción soluble en KOH 4M y en el residuo insoluble en ese álcali fuerte. En tal sentido, sería factible que el blanco de la actividad resultante de la expresión de *AdGAL1* no estuviera asociado

con la mayoría de las pectinas de la pared celular, que resultan solubilizadas por soluciones de CDTA o Na_2CO_3 , sino con los polímeros pécticos que permanecen fuertemente unidos a los glicanos de matriz. En cambio, utilizando una metodología de fraccionamiento de la pared celular diferente, Li et al. (2006) asocian un porcentaje importante de pérdida de galactosa a las fracciones pécticas extraídas con EDTA en caliente.

Al igual que sucede con el gen *AdGAL1* clonado en esta Tesis, se informó la existencia de genes codificantes de β -Gal en otros frutos climatéricos, que se expresan mayormente durante la maduración o exclusivamente en la maduración. Entre los primeros se cuentan *pABG1* de manzana (Goulao et al., 2008) y *PpGAL4* de pera europea (Mwaniki et al., 2005). Si bien Ross et al. (1994) informaron que *pABG1* se expresa únicamente en la maduración, Goulao et al. (2008) detectaron además una acumulación de transcritos de *pABG1* en la Fase I de cuaje del fruto. Entre los genes codificantes de β -Gal que –hasta donde se conoce– se expresan solamente en la maduración se destacan *TBG4* en tomate (Smith et al., 1998, 2002), *JP-GAL* en pera japonesa (Tateishi et al., 2001b) y *PpGAL1* en pera europea ‘La France’ (Mwaniki et al., 2005), todos genes que presentan una alta homología con *AdGAL1*. Sin embargo, es importante señalar que no se informó la expresión de *JP-GAL* de pera japonesa durante todo el crecimiento, sino sólo en la etapa final del mismo, desde 1-1,5 mes antes de alcanzar la madurez de consumo (Tateishi et al., 2001b). En los frutos de tomate, la acumulación de transcritos de *TBG4* (gen con mayor grado de identidad con *AdGAL1*, medido tanto como porcentaje de ADN como de aminoácidos) se observa recién en el estado “rompiente”, con un aumento en el estado “virado”, disminuyendo cuando el fruto alcanza su maduración completa (Smith y Gross, 2000). El bloqueo de la expresión de *TBG4* de tomate mediante técnicas antisentido resultó en frutos con hasta 40% más de firmeza en el estado maduro, confirmando un rol para *TBG4* en el ablandamiento (Smith et al., 2002). En frutos como el tomate, se propuso que los galactanos pueden regular la porosidad de la pared celular e influir en la actividad de otras enzimas de pared. Sin embargo, la liberación de galactosa y la solubilización de las pectinas son dos procesos que no parecen estar estrechamente vinculados en kiwi (Schröder y Atkinson, 2006).

4.5.2. Expresión de *AdARF/XYL1* y *AdARF1* durante la ontogenia

Además de la pérdida de galactosa, se registra una pérdida de arabinosa de la pared celular en distintos momentos del desarrollo del kiwi (Redgwell et al., 1997b; Li et al., 2006). Según Redgwell et al. (1997b), tanto la galactosa como la arabinosa se distribuyen por igual entre las fracciones solubles en KOH y el residuo de pared celular insoluble a KOH, con una pérdida importante a través de la ontogenia del fruto. Por otra parte, Li et al. (2006) detectaron pérdidas apreciables de arabinosa, tanto en el crecimiento temprano (aproximadamente 8-12 semanas después de antesis) cuanto durante la maduración (20-25 semanas después de antesis). En las últimas 5 semanas de la ontogenia, los niveles de arabinosa en la fracción péctica de las paredes celulares del mesocarpo caen aproximadamente 70%, y también se registran pérdidas importantes de arabinosa en la fracción soluble en KOH 24% conformada por glicanos de matriz (Li et al., 2006).

A diferencia de la acumulación de ARNm de *AdGALI* –restringida mayormente al momento de la maduración– la acumulación de transcritos de *AdARF/XYL1* en el mesocarpo externo fue relativamente estable a lo largo de toda la ontogenia (Figura 3.19), pero en columela disminuyó en la Fase IV, particularmente en el día 175 (Figura 3.20). En cambio, *AdARF1* mostró un patrón de expresión ligeramente creciente en el mesocarpo externo a través de toda la ontogenia del fruto, en tanto que la expresión en la columela se mantuvo casi invariable en el tiempo (Figuras 3.19, 3.20). De cualquier forma, no existen suficientes pruebas que permitan aseverar con certeza que *AdARF/XYL1* y *AdARF1* sean genes constitutivos, ya que: (1) no evidencian niveles de transcripción relativamente constantes en todos los tejidos (por ejemplo, casi no hay acumulación de transcritos de *AdARF/XYL1* en columela en el día 175); (2) un gen constitutivo puede no evidenciar el mismo nivel de señal de transcripción en todas las células, sino una señal algo menor en células con grandes vacuolas y una señal mayor en células pequeñas con citoplasma denso: éste no parece ser el caso de *AdARF1*, cuya acumulación de transcritos en mesocarpo externo es ligeramente creciente mientras el fruto incrementa su tamaño y, con él, el tamaño de sus células y de sus vacuolas.

Estos patrones de transcripción de *AdARF/XYL1* y *AdARF1* que se extienden a toda la ontogenia no se producen exclusivamente en kiwi: recientemente se encontraron patrones similares en durazno, fruto caracterizado por fuertes pérdidas de arabinosa de su pared celular (Di Santo et al., 2009). En efecto, los transcritos de *PpARF1* de

durazno se detectaron en todas las fases, aunque con un leve aumento de la expresión en la fase de esclerificación del endocarpo, mientras que los transcritos de *PpARF/XYL* fueron más elevados en las fases de multiplicación celular, de agrandamiento celular temprano y de tamaño máximo del fruto. Asimismo, Rosli et al. (2009) clonaron tres genes putativamente codificantes de α -Ara, los cuales se expresaron durante toda la ontogenia del fruto, aunque con diferencias en cuanto a los niveles de acumulación de transcritos de cada gen en dos cultivares de firmeza contrastante. En el fruto de tomate, la expresión del gen *LeARF1* fue más elevada durante el desarrollo temprano del fruto que en el fruto en estado verde maduro (Itai et al., 2003), en correspondencia con la actividad de α -Ara II previamente caracterizada (Sozzi et al., 2002).

Sin embargo, también en tomate se demostró la existencia de otras isoformas de α -Ara, con distintas características enzimáticas y moduladas de manera diferente por variados reguladores del crecimiento, capaces de liberar arabinosa de otras fracciones de la pared celular (Sozzi et al., 2002), lo que permite hipotetizar la existencia de una familia multigénica. Asimismo, la expresión del gen *PpARF2* en pera japonesa fue detectada solamente en la maduración del fruto (Tateishi et al., 2005). En pera europea, la expresión del gen *PcARF1* fue observada a niveles bajos durante la etapa inmediatamente previa a la maduración, incrementándose la acumulación de transcritos al iniciarse la maduración del fruto y manteniéndose niveles similares de transcripción durante la maduración (Mwaniki et al., 2005), por lo que este gen podría estar involucrado en el proceso de maduración de ese fruto. En resumen, no resulta improbable la existencia de familias multigénicas codificantes de diferentes α -Ara en frutos de muchas especies, con predominancia de actividad de alguna de las isoformas durante el ablandamiento, al igual que sucede con β -Gal. En cualquier caso, α -Ara no parece ser una enzima que pueda considerarse de primer orden en cuanto a su probable incidencia en el ablandamiento del kiwi ya que, si bien los porcentajes de pérdida de arabinosa observados en la maduración son significativos (Gallego y Zarra, 1997; Redgwell et al., 1997b; Li et al., 2006), los valores absolutos de arabinosa son mucho menores que los registrados para galactosa.

4.5.3. Expresión de *AdPLI* durante la ontogenia

La actividad de PL se detectó en especies diversas de plantas superiores, en las cuales las enzimas correspondientes resultan a menudo codificadas por familias de genes (Marín-Rodríguez et al., 2002). También se estudió extensamente en agentes causales de podredumbres blandas, como las bacterias del género *Erwinia* (De Lorenzo et al., 1991; Norman-Setterblad et al., 2000), en las que la acción de PL resulta, no sólo en la maceración de los tejidos vegetales, sino en la activación de los sistemas de defensa. El interés por las PL y por sus genes codificantes en frutos se desencadenó a partir de su posible contribución en la despolimerización de las pectinas y en la pérdida de firmeza de los frutos durante su maduración. Esto se expuso a la consideración científica al aislarse genes putativamente codificantes de PL cuyas expresiones se restringían a la maduración, primero en banana (Domínguez-Puigjaner et al., 1997; Pua et al., 2001), donde son particularmente abundantes (Medina-Suárez et al., 1997), y en frutilla (Medina-Escobar et al., 1997; Jiménez-Bermúdez et al., 2002; Benítez-Burraco et al., 2003). También se encontraron en bayas como la uva (Nunan et al., 2001). Como continuación de los primeros trabajos, y utilizando líneas transgénicas de frutillas con una reducción de más del 90% en la abundancia de transcriptos de PL, Santiago-Doménech et al. (2008) indicaron la existencia de claras diferencias cuanti y cualitativas en las poblaciones de polímeros pécticos, tanto en extractabilidad cuanto en sus pesos moleculares, como así también pérdidas menores de adhesión entre células, lo cual indicaría la importancia de la PL en el ablandamiento. En kiwi, la expresión del gen *AdPLI* fue muy elevada en los días 17 y 31 –en esta última fecha tanto en mesocarpo (Figura 3.19) como en columela (Figura 3.20)– durante la Fase I en la cual, en razón de la multiplicación celular, se incrementa el contenido de pared celular. No se observó expresión de dicho gen durante las fases posteriores, hasta el día 175 (Fase IV, Estadio 1 de maduración), en el que se verificó una ligera acumulación de transcriptos en el mesocarpo (Figura 3.19). En *Arabidopsis* se documentaron resultados que involucran a genes codificantes de PL en numerosos aspectos del crecimiento y desarrollo, tanto dependientes como independientes de la separación celular (Sun y van Nocker, 2010), cuya especialización se produce a menudo a través de regulaciones espaciales o temporales, sin dejar de considerar la posible redundancia de actividades y la especialización funcional determinada a nivel post-transcripcional o proteico.

Por otra parte, los resultados de esta Tesis se encuentran en concordancia parcial con otros hallados previamente en manzana, en donde la expresión del gen *MdPL1* se detectó durante el crecimiento del fruto. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucede con la expresión el gen *MdPL1*, la expresión de *AdPL1* en kiwi no se restringe al crecimiento del fruto, sino que se presenta una manifestación de importancia en la maduración, como se verá más adelante.

4.5.4. Expresión de *AdEXP1* y *AdEXP2* durante la ontogenia

En un trabajo anterior, se demostró que el gen *AdEXP1* está emparentado filogenéticamente a la familia de Exp denominada “EXPA”, mientras que el gen *AdEXP2* se vincula con la llamada familia “EXPB” (Yang et al., 2007). Los miembros de la familia EXPA, tales como *LeEXP1* de tomate (Rose et al., 1997), se involucran principalmente en la maduración del fruto, en tanto que los miembros de la familia EXPB se relacionan mayormente con procesos que requieren de una rápida expansión celular. Sin embargo, algunos miembros de esa familia, tales como *PaEXP1* y *PaEXP2* de damasco se expresan también durante la maduración (Mbéguié-A-Mbéguié et al., 2002).

Yang et al. (2007) solamente indicaron que *AdEXP1* y *AdEXP2* de kiwi se expresan durante la maduración del fruto. Esta Tesis establece que ambos genes se expresan tanto en el crecimiento como en la maduración, y tanto en el mesocarpo externo como en la columela (Figura 3.19, 3.20). Aunque la magnitud de la acumulación de transcritos de ambos genes es diferente en los distintos momentos de la ontogenia, existe superposición de la expresión de *AdEXP1* y *AdEXP2* en varias fases.

El gen *AdEXP1* se expresa en mesocarpo externo durante toda la ontogenia del fruto (Figura 3.19). Sin embargo, y por razones más manifiestas que las ya expresadas para *AdARF/XYL1* y *AdARF1*, no se puede catalogar a *AdEXP1* como un gen constitutivo, ya que no muestra un nivel relativamente constante de transcripción y no se expresa de igual forma en todas las células del organismo (por ejemplo, de mesocarpo externo y de columela). En mesocarpo externo, *AdEXP1* alcanza tres momentos de mayor expresión, a saber: a) en los días 17-31 (Fase I, durante el final de la etapa de multiplicación celular y comienzo del período de agrandamiento celular), b)

en menor medida, en los días 90-111 (Fase III, que constituye un segundo período de crecimiento por agrandamiento celular) y, c) en mayor medida, en los días 154-175 (Fase IV, Estadio 1 de maduración) en los cuales se alcanza el máximo tamaño y se producen los primeros cambios metabólicos conducentes a la pérdida de firmeza. El primer incremento coincide con un pico de acumulación de transcritos de *AdPL1*, lo que permitiría inferir que en esa etapa podrían registrarse simultáneamente una rápida extensión de la pared, por disrupción de interacciones no covalentes –como los puentes de hidrógeno– entre microfibrillas de celulosa y glicanos de matriz y, por otra parte, ciertos cambios en la estructura de las pectinas. Llamativamente, los niveles de transcripción de *AdEXP1* en columela son relativamente más bajos que en mesocarpio, salvo en el día 175 (Figura 3.20). Por su parte, en el tejido del mesocarpio externo, *AdEXP2* presenta picos de expresión temporalmente similares a los de *AdEXP1*, con magnitud máxima en los días 154-175 (Figura 3.19). En columela, la mayor acumulación de transcritos de *AdEXP2* coincide con la de *AdEXP1*, en el día 175 (Figura 3.20).

El mecanismo de acción de las Exp no se ha resuelto y su acción in muro permanece desconocida. Sin embargo, ciertos hechos sugieren que las Exp debilitan las interacciones glicano-glicano, interactuando en la interfase celulosa-glicanos de matriz (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994; Cosgrove, 1999, 2000a, 2000b). Como su nombre sugiere, las Exp fueron propuestas en primer término como proteínas que actúan durante la expansión celular, promoviendo la relajación de la pared frente al estrés generado por la presión de turgencia. En tal sentido, resulta razonable que se produzcan acumulaciones de transcritos de *AdEXP1* y *AdEXP2* en momentos de expansión celular del mesocarpio (por ejemplo, días 90-111). Por otra parte, los niveles elevados de transcripción en mesocarpio externo de *AdEXP1* y *AdEXP2* en los días 154-175, y en columela en el día 175 –y en menor grado en el día 154– momentos en que la expansión ya no es estadísticamente significativa, indican que estos genes pueden contribuir al inicio del desensamblaje de la pared celular. Redgwell y Fischer (2002) señalaron que uno de los síntomas más tempranos del ablandamiento de ciertos frutos como el kiwi es una ligera dilatación o hinchamiento de la pared celular que ocurre antes de que se pongan en evidencia cambios ocasionados por las hidrolasas a la estructura primaria de los polímeros de la matriz. Y en este sentido, Exp como las codificadas por *AdEXP1* y *AdEXP2* podrían promover este hinchamiento, por su capacidad para debilitar las

interacciones glicano-glicano. Entre las características que distinguen al kiwi se destaca el hecho de presentar un hinchamiento de las paredes celulares muy marcado, tanto in vivo como in vitro, mientras que otros frutos de textura fundente (tomate, frutilla, ciruela, kaki, etc.) sólo manifiestan un hinchamiento de las paredes celulares in vitro (Redgwell et al., 1997a). El hinchamiento de la pared celular del kiwi durante el ablandamiento, sea natural o inducido por etileno, y su vinculación con la expresión de *AdEXP1* y *AdEXP2*, se discute más adelante.

4.6. La expresión génica de *AdGAL1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* durante la maduración del kiwi guarda relación con las principales modificaciones de la pared celular observadas durante el ablandamiento

4.6.1. Variación de la firmeza

La mayor parte de las investigaciones sobre firmeza en el kiwi se efectuó utilizando el tejido del mesocarpo externo de frutos ‘Hayward’ tratados con etileno (ver Schröder y Atkinson, 2006 y trabajos allí citados). El tratamiento con etileno se realiza usualmente a fin de uniformar el inicio del ablandamiento en el lote de frutos utilizados en el ensayo, disminuyendo la variabilidad. Sin embargo, esto podría objetarse para el estudio de los genes codificantes de proteínas vinculadas a la maduración, por cuanto un tratamiento de 24 h con etileno es suficiente para desencadenar procesos dependientes de este regulador que no necesariamente se producen en los inicios de la maduración “normal” del kiwi, en ausencia de etileno. Por esa razón, se estudió en primer término el ablandamiento del kiwi en ausencia de etileno exógeno. Mientras que el ablandamiento normal del kiwi se produce en el término de 3-4 semanas, el ablandamiento del kiwi tratado con etileno sucede en 6-7 d.

Como se comentó en la Introducción, existe una separación temporal del proceso de maduración en tres estadios. El inicio de la maduración (Figura 3.17, días 175-196) es una etapa en la cual el ablandamiento es muy lento, con lecturas de firmeza iniciales cercanas a 80-85 N (Estadio 1). Transcurridos unos días, el ablandamiento se acelera (representado en la Figura 3.21 por los días 0-16), disminuyendo la firmeza desde 70 N hasta 20 N o menos, denominándose a esta etapa el Estadio 2. Este proceso ocurre

mayormente en forma independiente de la presencia de etileno. Finalmente, el Estadio 3 de la maduración se caracteriza por la presencia de un pico de producción autocatalítica de etileno y una pérdida más lenta de la firmeza (representado en la Figura 3.21 por los días 20 y 23, en los que la firmeza se estabiliza en 7-5 N), que lleva al fruto desde condiciones apropiadas para su consumo hasta la sobremadurez.

4.6.2. Comparación cronológica de la expresión génica durante la maduración

4.6.2.1. Estadio 1

Como se comentó anteriormente, el Estadio 1 de maduración del kiwi se caracteriza por un ablandamiento lento, acompañado fundamentalmente por una dilatación (hinchamiento) de la pared celular. Las observaciones microscópicas denotan que las paredes celulares, finas y compactas en frutos inmaduros, comienzan a mostrarse difusas, manifestándose hinchadas y engrosadas, con menor capacidad de tinción a medida que la maduración procede (Hallet et al., 1992). In vitro, el fenómeno se puede observar con mayor claridad (Redgwell et al., 1997a): al ser suspendido en agua, el material aislado de la pared celular muestra que el hinchamiento de la pared comienza hacia el final del Estadio 1 de ablandamiento. Más aún, existe una correlación entre la dilatación de la pared celular y el grado de solubilización de las pectinas, lo que sugiere que el hinchamiento de la pared puede ocurrir como resultado de cambios en las propiedades viscoelásticas de la pared celular durante la solubilización de las pectinas (Redgwell et al., 1997a). La remoción química/enzimática de ciertas pectinas de la pared celular permite sostener la hipótesis de que la dilatación de la pared celular podría estar asociada con el movimiento de agua en los espacios vacíos dejados en la red de celulosa-glicanos de matriz por la pectina solubilizada. Sin embargo, el proceso de dilatación de la pared celular podría ser más complejo: los cambios físico-químicos conducentes al hinchamiento de la pared podrían implicar otros tipos de modificaciones, que involucren tanto a las pectinas como a los complejos de celulosa-glicanos de matriz. Las Exp podrían estar comprometidas en estos procesos, ya que la expansión de la pared por ruptura de los puentes de hidrógeno entre celulosas y xiloglucanos, podría producir una relajación temporaria de la pared celular. En kiwi, se observó que una Exp purificada es capaz de liberar pectina de la pared celular aislada de frutos inmaduros

(Koh y Schröder, datos no publicados, citados por Schröder y Atkinson, 2006). Esto sugiere que la acción de las Exp podría conducir a la solubilización de las pectinas, lo cual podría ocurrir si las Exp obraran además de cuña entre los polímeros de la red de glicanos de matriz, permitiendo a las pectinas difundir y solubilizarse sin degradación aparente. Los espacios vacíos dejados por las pectinas podrían llenarse de agua, cuya manifestación visible sería el hinchamiento de la pared celular. En concordancia con lo anterior, el hinchamiento de la pared se produce inmediatamente después de observada la máxima expresión de *AdEXP1* y *AdEXP2*. Este es un ejemplo más de la complejidad y diversidad de los fenómenos abordados, ya que plantas de tomate transgénicas que sobreexpresan al gen *LeEXP1* producen frutos más blandos que los controles correspondientes, pero alterando la despolimerización de las hemicelulosas estructurales, sin aparente despolimerización de poliuronidos (Brummell et al., 1999).

Entre los genes estudiados, *AdEXP1* y *AdEXP2* son aquéllos que se expresan más temprano en la maduración, ya que se acumulan elevadas cantidades de transcritos de ambos en los días 154 y 175 (Estadio 1 de maduración) en el mesocarpo (Figura 3.19), y mayormente en el día 175 en la columela, con posterior disminución (Figura 3.20). En el proceso de hinchamiento de la pared celular podría además contribuir la desesterificación de las pectinas, que produciría un incremento en las fuerzas de repulsión entre cadenas de pectinas adyacentes. En trabajos previos, se observó un incremento de la actividad de PME en el Estadio 1 (Wegrzyn y MacRae, 1992), aunque esto debe considerarse con reserva, ya que el ensayo fue efectuado utilizando frutos previamente tratados con etileno.

El Estadio 1 se acompaña por la expresión de *AdGAL1*, principalmente en el día 175 tanto en mesocarpo como en columela (Figuras 3.19 y 3.20). Si bien la pérdida de galactosa suele asociarse principalmente a los Estadios 2 y 3 de la maduración en frutos tratados con etileno (Redgwell et al., 1992; Schröder y Atkinson, 2006), el análisis de los principales azúcares neutros de las fracciones digeridas por amilasa señala que la mayor parte de la galactosa se pierden en etapas tempranas de la maduración (Li et al., 2006): en efecto, en el trabajo de Li et al. (2006), la maduración completa se produce entre las semanas 20 y 25, y la mayor pérdida de galactosa se produce en todas las fracciones analizadas entre las semanas 20 y 22 (74% de la galactosa de la fracción péctica; 38 % de la fracción soluble en KOH 4% y 66% de la fracción soluble en KOH

24%). En tal sentido, la expresión de *AdGALI* puede contribuir a que se produzcan tales pérdidas.

Redgwell et al. (1997b) encontraron en kiwi una correlación elevada entre la solubilización de las pectinas, la dilatación de la pared celular y el ablandamiento, pero no encontraron correlación de similar índole con la pérdida de galactosa. En frutos tratados con etileno, la pérdida de galactosa ocurre cuando la solubilización de las pectinas, el hinchamiento de la pared celular y el ablandamiento ya han comenzado. Este resultado indica que la pérdida de galactosa y la solubilización de las pectinas son procesos independientes, ya que la remoción de las cadenas laterales constituidas por galactosa de los polisacáridos pécticos no es necesaria para la solubilización de éstos. Por otra parte, los kiwis que permanecen en la planta durante su ablandamiento también muestran la solubilización de las pectinas, un hinchamiento de las paredes celulares y la pérdida de galactosa, pero el orden relativo de esos eventos difiere del que se observa durante el ablandamiento de los frutos cosechados en estado de madurez fisiológica (85 N) y tratados con etileno. En frutos dejados en el árbol durante la maduración, se verifica la correlación entre el hinchamiento de la pared celular y la solubilización de las pectinas, pero la pérdida de galactosa comienza con antelación, en el Estadio 1 de maduración en el que los frutos tratados con etileno no evidencian ninguna pérdida de galactosa (Redgwell y Percy, 1992). Esto significa que ninguno de los cambios mencionados que podrían resultar claves en la pared celular determina la iniciación y el desarrollo de los restantes (Redgwell y Percy, 1992). En el caso de esta Tesis, la expresión de los genes *AdEXPI* y *AdEXP2* antecede a la expresión de *AdGALI* durante el Estadio 1 de maduración (Fase IV) (Figuras 3.19 y 3.20), pero todos alcanzan un máximo en el día 175, aunque podrían ser independientes entre sí.

A lo anteriormente comentado se suma una acumulación ligera de transcritos de *AdPLI* en mesocarpo, también en el día 175 (Figura 3.19), que podría tener influencia en la solubilización de aquellos polisacáridos pécticos más pequeños y menos ramificados. Redgwell et al. (1992) observaron que las pectinas solubilizadas en la primera etapa del ablandamiento son similares a las pectinas extractables a cosecha con Na_2CO_3 . Estos autores hipotetizaron que los polisacáridos pécticos de menor peso molecular y con menos ramificaciones se solubilizan primero, y que los polisacáridos con mayor peso molecular, más ramificados y unidos más fuertemente a la pared, toman

el lugar de los anteriores durante el proceso de ablandamiento, quedando unidos en forma más laxa.

4.6.2.2. Estadio 2

En los días 1 y 9 del ensayo de postcosecha (correspondientes al Estadio 2 de maduración) (Figura 3.21), se verifican diferencias marcadas entre la expresión de genes en el mesocarpo externo y en la columela (Figura 3.22). En el mesocarpo, sólo se observan pequeñas acumulaciones de transcritos de *AdEXPI* y *AdEXP2* en el día 1, pero no en el día 9, aunque la expresión aparece nuevamente en el día 16, probablemente por la notable sensibilidad de estos genes a la presencia de etileno (ver más adelante). En cambio, es llamativa la ausencia de transcritos de *AdGALI* y *AdPLI* en los días 1, 9 y 16.

Por su parte, los genes se expresan en la columela de la siguiente forma (Figura 3.22): *AdGALI* (día 1), *AdPLI* (día 1 y, en menor medida, en días 9 y 16), y *AdEXPI* y *AdEXP2* (con una disminución de *AdEXPI* en el día 9). La acumulación de transcritos de *AdARF1* y *AdARF/XYL1* se observa durante toda la maduración sin variaciones muy marcadas en general, aunque con un aumento significativo en el día 9, tanto en mesocarpo externo como en columela.

Según las investigaciones de Redgwell y de su equipo con kiwis tratados con etileno, el Estadio 2 se caracteriza fundamentalmente por la pérdida de galactosa, la degradación de las pectinas solubles y la disminución del peso molecular de los xiloglucanos (ver MacRae y Redgwell, 1992 y trabajos allí citados). Sin embargo, ya se ha discutido en esta Tesis que no resulta fácil comparar los resultados obtenidos con lotes de frutos uniformados por la aplicación inicial de etileno con frutos en los que no se aplicó etileno inicialmente. Por otra parte, existen diferencias entre los resultados obtenidos por diferentes laboratorios y condiciones al respecto (ver Redgwell y Percy, 1992; Redgwell et al., 1992; Redgwell et al., 1997b; Gallego y Zarra, 1997; Li et al., 2006). En cualquier caso, los cambios de firmeza que se producen en el Estadio 2 parecen ser diferentes en mesocarpo y columela y, salvo en el día 16, esos cambios serían independientes de la biosíntesis de etileno y no parecen vinculados en el mesocarpo con los genes estudiados. En esta Tesis, el día 16 representaría un momento de transición entre los Estadios 2 y 3 (Figuras 3.21 y 3.22).

4.6.2.3. Estadio 3

El Estadio 3 se inicia con el comienzo de la síntesis de etileno (Figura 3.21), y en él alcanza su máxima expresión la dilatación de la pared celular –en el momento en que el kiwi se encuentra en madurez de consumo– que se iniciara en el Estadio 2 (Redgwell et al., 1997a). En correlación con esta dilatación –según lo comentado para el Estadio 2–, la acumulación de transcritos de *AdEXP1* y *AdEXP2* se extiende entre los días 16 y 23, con un pico en el día 20, tanto en el mesocarpo externo como en la columela (Figura 3.22).

En conjunción con lo anterior, la degradación de la pectina solubilizada y la pérdida de la lámina media son procesos que se inician en el Estadio 2 de maduración pero alcanzan su máximo en el Estadio 3. En efecto, la ruptura de la lámina media es visible por microscopía electrónica en muestras obtenidas al finalizar el Estadio 2 y en el Estadio 3 de maduración (Hallet et al., 1992). La pectina extraída con solución de CDTA, que se considera implicada en la constitución de la lámina media que mantiene adheridas las células entre sí, también decrece en el rendimiento y en el peso molecular durante el ablandamiento (Redgwell et al., 1990), confirmando así la información suministrada por las técnicas de microscopía. Más aún, usando inmunomarcación con anticuerpos JIM5, marcación de lectinas y marcación catiónica con oro coloidal, no resulta posible encontrar una lámina media “típica” (Sutherland et al., 1999). Estos procesos confluyen en la desintegración de la pared celular, que se produce en forma completa al final del Estadio 3. A los genes codificantes de Exp ya citados, sumarían su participación en estos fenómenos el gen *AdPL1*, con máxima expresión en el día 20, tanto en el mesocarpo externo como en la columela (Figura 3.22). Por otra parte, se caracterizaron tres genes de PG en kiwi (Wang et al., 2000): *CkPGA* y *CkPGB*, que se expresan sólo en el Estadio 3 de maduración, y *CkPGC* cuya expresión máxima también se alcanza en el Estadio 3. Es, pues, probable que la actividad de PG esté más relacionada con la degradación de las pectinas (que acontece mayormente en el Estadio 3) que con su solubilización (que, en buena medida, tiene lugar en el Estadio 1).

Anteriormente se señaló que el período de máxima pérdida de galactosa no parecería coincidir con el período de máxima actividad de β -Gal. Según MacRae y Redgwell (1992) y trabajos allí citados, el período de mayor liberación de galactosa coincidiría con el Estadio 2 de maduración/ablandamiento. Li et al. (2006) señalan importantes pérdidas de galactosa en la etapa inicial del ablandamiento, entre las

semanas 20 y 22, mientras que las pérdidas de galactosa continúan en las semanas 22 a 25, aunque con menor magnitud. En cambio, la actividad de β -Gal permanece constante en las primeras etapas, en tanto que se incrementa tardíamente en el Estadio 3 (Wegrzyn y MacRae, 1992; Bonghi et al., 1996). La expresión máxima de *AdGAL1* se produce en concomitancia con la máxima actividad de β -Gal de estos trabajos, en el día 20 en mesocarpo externo y en los días 20 y 23 en columela (Figura 3.22), lo que podría indicar un papel para este gen en el proceso de pérdida final de galactosa de la pared celular, acompañando la dilatación máxima y desintegración de dicha pared, y la degradación de sus pectinas.

El Estadio 3 se completa con la expresión de *AdARF1* y *AdARF/XYL1*, tanto en mesocarpo como en columela, pero en niveles no sobresalientes (Figura 3.22).

4.7. La expresión génica de *AdEXP1*, *AdEXP2*, *AdGAL1* y *AdPL1* durante la maduración del kiwi es modulada por el etileno, pero manifestando diferencias en los niveles, tiempos y formas de respuesta

4.7.1. Variación de la firmeza

La aplicación de etileno y de 1-MCP en frutos con niveles de firmeza de 33 N – es decir, en pleno Estadio 2 de maduración– produce, en el término de 48 h, diferencias significativas en los niveles de firmeza de los frutos, tanto entre los dos tratamientos mencionados como entre esos tratamientos y los frutos control no tratados (Figura 3.23). Más aún, el tratamiento con 1-MCP genera diferencias en los niveles de firmeza de los frutos respecto de los restantes tratamientos en sólo 24 h. Esto indica una vez más la capacidad excelente del 1-MCP para bloquear los mecanismos conducentes al ablandamiento del kiwi en la mayoría de los estadios de maduración, en concordancia con resultados previos hallados en esta Tesis (Figuras 3.1, 3.2, 3.4, 3.6, 3.7 y 3.8).

4.7.2. Modulaciones de expresión génica por etileno

El nivel de firmeza inicial de los frutos en el ensayo en que se evaluaron los efectos del etileno y del 1-MCP (Figura 3.23) fue intermedio al correspondiente a los

días 9 y 13 del ensayo de postcosecha (Figura 3.21). En el día 9 del ensayo de poscosecha no se verifica expresión en mesocarpio de *AdEXP1*, *AdGAL1* y *AdPL1* (Figura 3.22). De igual forma, en el inicio (día 0) del ensayo de evaluación de los efectos del etileno y del 1-MCP, los frutos control no muestran acumulación de transcritos de los citados genes, salvo trazas en el caso de *AdEXP1* (Figura 3.24). Más aún, tampoco se verifica acumulación de transcritos de los genes *AdGAL1*, *AdEXP1* y *AdPL1* en los frutos control durante las 48 h de duración del ensayo (Figura 3.24). En cuanto a *AdEXP2*, se verifica en los frutos control niveles de expresión intermedios durante todo el ensayo. La exposición al etileno $10 \mu\text{L L}^{-1}$ induce una respuesta en todos los genes citados, aunque con diferencias en los niveles, tiempos y formas de respuesta. Cabe mencionar que la concentración utilizada es similar a la empleada en la mayoría de los estudios de genes regulados por etileno, en toda la bibliografía.

La acumulación masiva de transcritos de *AdEXP1* fue la primera en ser detectada, en el término de sólo 3 h, alcanzando su máximo a las 24 h (Figura 3.24). *AdGAL1* mostró una acumulación limitada de transcritos a las 3 h, pero máxima a las 6 h, en tanto que *AdPL1* mostró su primera y máxima acumulación de transcritos a las 24 h (Figura 3.24). En el caso de *AdEXP1* y de *AdGAL1*, el tiempo en que se produce la transcripción de los genes indica que la respuesta al etileno es muy rápida y que su expresión sería directamente dependiente del etileno. La ausencia de transcripción de los genes citados a lo largo de todo el ensayo en respuesta a la aplicación de 1-MCP respalda los resultados hallados por aplicación de etileno (Figura 3.24). En cuanto a *AdEXP2*, la aplicación de etileno exacerbó la expresión génica durante todo el ensayo respecto de los frutos control, en tanto que la aplicación de 1-MCP inhibió la acumulación de transcritos durante las primeras 24 h (Figura 3.24).

La expresión de *AdEXP1* en respuesta a la aplicación de etileno también fue verificada por Yang et al. (2007), quienes registran incrementos en los niveles de expresión a partir de las 6 h. En esta Tesis se verificó una importante acumulación de transcritos en sólo 3 h. Este hecho, sumado al antecedente de la transcripción del gen en situación de muy baja tasa de biosíntesis de etileno ($< 0,35 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) con acumulaciones similares de transcritos a las registradas en situaciones de alta tasa de producción de etileno (Yang et al., 2007), permite catalogar a *AdEXP1* como un gen altamente sensible al etileno y aseverar el cumplimiento de las dos condiciones requeridas para calificarlo como dependiente del etileno, aunque no exclusivamente. Su

expresión en momentos de la ontogenia en que la biosíntesis de etileno es nula permite entrever la existencia de otros mecanismos de modulación para este gen.

Por su parte, Yang et al. (2007) también verificaron los incrementos en los niveles de transcritos de *AdEXP2*, aunque en tiempos mayores a los registrados en esta Tesis. Su expresión en fases de la ontogenia en que la producción de etileno es nula permite hacer extensivo a este gen las aseveraciones ya enunciadas para *AdEXP1*.

Cabe mencionar que la presencia de etileno fue capaz de incrementar los niveles de expresión de genes codificantes de Exp en frutos climatéricos de diferentes especies. Por ejemplo, *LeEXP1* de tomate se expresa específicamente en frutos en maduración y es regulada por etileno (Rose et al., 1997). Asimismo, la acumulación de *PchExp1* y *PpExp3* ARNm en durazno resultó ser regulada por la maduración e incrementada fuerte y rápidamente por un tratamiento con etileno (Hayama et al., 2000, 2006). En pera europea, la acumulación de transcritos correspondiente a los genes *PcExp2*, *PcExp3*, *PcExp5* y *PcExp6* se incrementa marcadamente con la pérdida de firmeza del fruto y luego declina en el estado sobremaduro (Hiwasa et al., 2003b). Ese incremento de transcritos de *PcExp2*, *PcExp3*, *PcExp5* y *PcExp6* es suprimido por la aplicación de 1-MCP, como también el ablandamiento del fruto, en tanto que la aplicación de propileno incrementa la expresión de los genes citados y acelera el ablandamiento. También se encontraron respuestas al etileno en la transcripción de los genes *MaEXP1* de banana (Trivedi y Nath, 2004), *MiExpA1* de mango (Sane et al., 2005), y *VpEXPA2* de papaya de montaña (Gaete-Eastman et al., 2009). En melón ‘Charentais’, no se observan diferencias importantes en los niveles de ARNm del gen *CmExp1* entre los frutos control y los frutos transgénicos con supresión de la ACO e inhibición del ablandamiento, salvo por una demora temporal (Nishiyama et al., 2007). Sin embargo, la aplicación de etileno incrementó la expresión de este gen, por lo cual es probable que esté asociado con la maduración y que sea parcialmente dependiente del etileno, pero que no juegue un papel en los procesos dependientes del etileno en el ablandamiento del melón.

Como se comentó anteriormente, la aplicación de etileno en los frutos aumentó ligeramente la acumulación de ARNm de *AdGAL1* en el término de 3 h, y drásticamente a las 6 y 24 h, decreciendo a las 48 h cuando el fruto alcanzó niveles de firmeza de ~11 N (Figura 3.24), en tanto que el 1-MCP inhibió toda expresión del gen. La expresión de *AdGAL1* registrada en kiwi en esta Tesis se vincula tanto con lo observado en la

actividad de β -Gal en este fruto cuanto con la expresión de genes codificantes de β -Gal y la actividad de esta enzima en otras especies. Boquete et al. (2004) evaluaron la inhibición que el 1-MCP produce en la actividad de diversas enzimas de pared celular del kiwi. Así, se conoce que el 1-MCP, al ser aplicado luego de 1 mes de conservación del kiwi a 0 °C, es capaz de inhibir el incremento de la actividad de la enzima β -Gal durante el almacenamiento posterior a 20 °C (Boquete et al., 2004). En peras europeas, se detecta una inhibición en el incremento de actividad de β -Gal durante la maduración por aplicación de 1-MCP (Trinchero et al., 2004). Asimismo, un tratamiento con propileno en pera europea estimula la acumulación de transcritos que hibridizan con *PpGAL1* y *PpGAL4*, mientras que sucede lo contrario en frutos tratados con 1-MCP, aunque la inhibición de la acumulación de transcritos que hibridizan con *PpGAL1* y *PpGAL4* no resulta completa (Mwaniki et al., 2005). El incremento de sus expresiones al inicio de la maduración de la pera es, en parte, debida a la regulación positiva por parte del etileno. En melón ‘Charentais’, los transcritos de *CmGal1* se acumulan de forma abrupta 2 d después del inicio de la maduración, y la transcripción resulta inhibida por aplicación de 1-MCP, lo que sugiere que la expresión de *CmGal1* es dependiente del etileno (Nishiyama et al., 2007).

Sin embargo, en esta Tesis, el gen *AdGAL1* no manifestó transcripción en el día 16 del ensayo de postcosecha, cuando los niveles de biosíntesis de etileno alcanzaban $2,28 \text{ ng kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que se observó una importante acumulación de transcritos de *AdEXPI* (Figura 3.22). La acumulación de transcritos de *AdGAL1* y de *AdPL1* recién se produjo en el día 20, al verificarse el pico máximo de producción de etileno (Figura 3.22). Esto podría indicar una diferente sensibilidad de estos genes al etileno.

Por otra parte, resultan llamativos los resultados de un trabajo anterior, en el que el tratamiento de discos de kiwi con un inhibidor de la biosíntesis de etileno inhibe el ablandamiento y la solubilización de las pectinas, pero no tiene influencia en la pérdida de galactosa (Redgwell y Harker, 1995). Este resultado sugiere que la pérdida de galactosa y la solubilización de las pectinas en el kiwi en maduración son procesos separados y que la pérdida de galactosa parecería ser, al menos parcialmente, independiente de la producción interna de etileno (Redgwell y Harker, 1995).

La acumulación de transcritos de *AdPL1* por exposición al etileno muestra una semejanza de lo señalado recientemente por Atkinson et al. (2011) y de lo que sucede en otros frutos climatéricos. En efecto, la principal acumulación de transcritos de

AdPL1 de kiwi se produce en concomitancia con la presencia de etileno, es decir, en frutos ya maduros durante la etapa final del ablandamiento (Figura 3.24). Esto coincide con los resultados de Atkinson et al. (2011), quienes verificaron mediante análisis de microarreglos que un gen de PL se expresa 24 h después de iniciado un tratamiento con etileno. En banana, el gen *Ban17* con homología de secuencia para PL, alcanza su máxima expresión en el pico climatérico y disminuye luego en frutos sobremaduros, en tanto que se induce la acumulación de transcritos en bananas en estado verde maduro por aplicación de etileno (Domínguez-Puigjaner et al., 1997). Luego de la aplicación de etileno en banana, no sólo la expresión, sino también la actividad de PL acompaña al pico de etileno (Payasi et al., 2004).

En cambio, en durazno, dos genes codificantes de PL (*Ctg 251* y *Ctg 257*) comienzan a expresarse en el estadio preclimatérico, alcanzan su máxima expresión durante la maduración, y muestran una caída significativa posteriormente, hasta alcanzar niveles indetectables (Trainotti et al., 2003). Por otra parte, Hayama et al. (2006) mostraron que los niveles de expresión de dos genes codificantes de PL permanecen sin cambios de significación durante la maduración de duraznos de pulpa “fundente” y “stony”. Esto muestra una vez más la diversidad génica que se manifiesta entre especies y en la misma especie.

Con todo, no caben dudas de que las particularidades en el kiwi se manifiestan con una frecuencia poco habitual. Wang et al. (2000) mostraron que, de tres genes putativamente codificantes de PG en el kiwi, *CkPGA* y *CkPGB* se detectan en frutos que producen etileno endógeno. Por otra parte, la expresión del gen *CkPGC* se observó en frutos en ablandamiento, y alcanzó sus niveles máximos (50 veces mayores que los de *CkPGA* y *CkPGB*) al pasar por el climaterio (pico de etileno). Sin embargo, la expresión de *CkPGC* también es detectable durante el desarrollo del fruto. Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo que sucede en la inmensa mayoría de los frutos, la PG en kiwi se requiere no sólo durante el período de degradación de la pared celular, sino también durante los períodos de su modificación y expansión. Algo similar sucede con *AdARF1* y *AdARF/XYL1*, que no manifiestan prácticamente respuestas a los tratamientos con etileno y 1-MCP.

4.8. Expresión génica de *AdGAL1*, *AdARF1*, *AdARF/XYL1*, *AdPL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* en otros tejidos

Ninguno de los genes estudiados en esta Tesis es específico de los frutos. *AdARF1*, *AdARF/XYL1* se expresan en todos los tejidos evaluados (Figura 3.25). Todos los restantes genes se expresan en raíces jóvenes en activo crecimiento y en hojas jóvenes en expansión. *AdEXP1* y *AdEXP2* y, en menor grado, *AdPL1* lo hacen en los estilos de la flor femenina. En menor medida, *AdGAL1*, *AdEXP1* y *AdEXP2* se transcriben en ovarios, pero no *AdPL1*. En pétalos, se registra acumulación de transcritos de *AdEXP1* y *AdEXP2*, mientras que en sépalos hay una ligera acumulación de transcritos de *AdEXP1* (Figura 3.25). Si bien existen numerosos casos de genes codificantes de enzimas/proteínas de pared celular cuya expresión es específica de frutos, no menos abundantes son los casos de genes de expresión inespecífica. Los siguientes son sólo algunos ejemplos:

1) β -Gal. En tomate, se detectaron siete genes codificantes de β -Gal; los transcritos de todos ellos –con la excepción de *TBG2*– no son específicos de tejidos de frutos. *TBG2* se expresa en niveles muy bajos y no es específico de la maduración (Smith y Gross, 2000). Más aún, el principal gen codificante de β -Gal implicado en el ablandamiento del fruto de tomate, *TBG4*, también se expresa en raíces (Smith et al., 1998). En manzano, la expresión de *pABG1* es significativa en todos los órganos/tejidos investigados además de los frutos (flores, pedúnculos, hojas jóvenes y adultas y, particularmente, pecíolos de hojas senescentes (Goulao et al., 2008). En vid, se detectó la expresión de *VvBG1*, no sólo en la baya sino también principalmente en la semilla (Nunan et al., 2001).

2) α -Ara. En duraznero, *PpARF1* y *PpARF/XYL* se expresan en todos los tejidos evaluados además de los de los frutos: hojas intactas en expansión, raíces de plántulas y órganos florales: sépalos, pétalos, estambres y ovarios no polinizados (Di Santo et al., 2009). En manzano, *MdAF1* se expresa en todos los tejidos investigados: flores, pedúnculos florales, hojas jóvenes y adultas y, particularmente, pecíolos de hojas senescentes (Goulao et al., 2008).

3) PL. En manzano, *MdPL1* se expresa en flores, pedúnculos florales y pecíolos de hojas senescentes (Goulao et al., 2008).

4) Exp. De los seis genes conocidos putativamente codificantes de Exp en las plantas de frutilla, sólo los clones *FaExp2* y *FaExp5* se expresan exclusivamente en las

frutillas (Civello et al., 1999; Harrison et al., 2001). En manzano, los transcriptos de *MdEXPA3* están presentes en flores en desarrollo, pecíolos y hojas jóvenes en expansión, aunque la amplificación resulta más débil que la obtenida en frutos (Goulao et al., 2008). En peral europeo se detectaron siete genes de Exp (Hiwasa et al., 2003b), pero sólo la acumulación de ARNm correspondiente a los genes *PcExp2*, *PcExp3*, *PcExp5* y *PcExp6* se incrementa marcadamente con el ablandamiento del fruto y luego declina en el estado sobremaduro. De estos genes, el ARNm de *PcExp6* se detecta también en flores y la acumulación de transcriptos de *PcExp5*, y *PcExp6* es más abundante en tejidos jóvenes en crecimiento.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

5.1. Comprobación de las hipótesis y resultados principales

A lo largo de esta Tesis se han analizado distintas situaciones funcionales a los objetivos propuestos a fin de poder dar respuesta a las hipótesis planteadas tal como se indica a continuación.

1) Como objetivo 1 se planteó la investigación de la acción del 1-MCP, inhibidor de la acción del etileno, sobre la expresión de los genes codificantes de ACS y ACO de kiwi bajo diferentes condiciones y en distintos momentos de postcosecha, y sus consecuencias en el ablandamiento del kiwi y en la síntesis del etileno. A partir del objetivo se formuló la hipótesis 1, a saber: “el 1-MCP produce una inhibición diferencial sobre la expresión de los genes codificantes de ACS y ACO, tanto espacial (en tejidos de mesocarpo externo y columela) como temporal (bajo diferentes condiciones de postcosecha) y un retraso en el ablandamiento del kiwi, aún en estados avanzados de maduración.” Esta hipótesis es aceptada en virtud de los resultados obtenidos en los experimentos 1-3 (Figuras 3.1-3.9). En efecto, se encontró que el tratamiento con 1-MCP, efectuado inmediatamente después de la cosecha, retarda marcadamente el ablandamiento del kiwi e inhibe la producción de etileno. Además, la magnitud de estos efectos es altamente dependiente de la región de cultivo, esto último en conformidad con los resultados obtenidos por otros autores respecto de la forma en que los factores meteorológicos y de manejo durante el cultivo afectan los índices de postcosecha (Okuse y Ryugo, 1981; Crisosto et al., 1984; MacRae et al., 1989). De hecho, el 1-MCP resulta ser un inhibidor capaz de retardar la pérdida de firmeza del kiwi, aún después de largos períodos de conservación en frío y en estados de ablandamiento avanzados (Figuras 3.4, 3.5, 3.8). Estos resultados permiten apoyar algunos resultados preliminares, profundizar el conocimiento alcanzado por algunos autores (Boquete et al., 2004; Koukounaras y Sfakiotakis, 2007; Vilas-Boas y Kader, 2007), y contradecir los resultados y las conclusiones de otro trabajo que sugiere la

ausencia de respuesta del kiwi al 1-MCP luego de un período prolongado de conservación a 0 °C (Kim et al., 2001), trabajo que marcó casi una década de discusiones sobre el tema. Los resultados de esta Tesis muestran que el 1-MCP inhibe por completo la expresión de los genes *KWACSI* y *KWACOI*, tanto en mesocarpo externo como en la columela, y que el momento de la transcripción de estos genes se correlaciona con el correspondiente pico de producción de etileno (Figura 3.1, A y 3.3). Este punto resulta decisivo por cuanto los trabajos previos solamente muestran un incremento en la acumulación de transcritos de *KWACSI* y *KWACOI* durante la maduración del kiwi, sin vincular con claridad dicho incremento con la acción del etileno y sin verificar los alcances de la acción del 1-MCP durante la maduración (Whittaker et al., 1997; Xu et al., 2000). Por otro lado, y profundizando los resultados presentados por la literatura previa en referencia a la inhibición de la acumulación de ARNm de *KWACSI* y *KWACOI* por el 1-MCP en *Actinidia* sp. (Whittaker et al., 1997; Xu et al., 1998), los resultados de esta Tesis ponen de manifiesto la existencia de una regulación positiva de la producción de etileno, concluyendo en que la expresión de los genes asociados a este proceso están bajo la regulación del Sistema 2 caracterizado por una retroalimentación positiva.

2) Como objetivo 2 se planteó la identificación y la clonación del gen codificante de la β -Gal en kiwi, y la evaluación de su expresión como así también la de otros genes codificantes de α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp durante el crecimiento, la maduración y el ablandamiento de los frutos, tanto en mesocarpo externo como en columela. A partir de ese objetivo se formuló la hipótesis 2, a saber: “existen distintos genes putativamente codificantes de las enzimas β -Gal, α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp de la pared celular, cuya expresión es diferente según el estado ontogénico, el tejido/órgano objeto de estudio y el grado del ablandamiento del fruto”. Esta hipótesis se corrobora en virtud de los resultados obtenidos con los experimentos 4, 5 y 6. En efecto, en esta Tesis se clonó el primer gen *AdGALI* putativamente codificante de β -Gal en kiwi (experimento 4), cuya secuencia mostró alta homología con β -Gal de otros frutos como tomate (Smith and Gross, 2000), pera (Mwaniki et al., 2005) y papaya (Othman et al., 2011), entre otros. Su expresión génica durante la ontogenia del kiwi y durante los ensayos de postcosecha vincula a este gen principalmente con la Fase IV, en particular con los Estadios 1 y 3 de maduración y ablandamiento tanto en mesocarpo externo como en columela, y también con el Estadio 2 en columela (Figura 3.19, 3.20 y

3.22). También se verifica en esta Tesis la expresión en kiwi de *AdARF1*, *AdARF/XYL1*, y *AdPL1*, genes de los que se obtuvo por vez primera las secuencias parciales putativas, evaluándose sus expresiones conjuntamente con las de dos genes codificantes de Exp, tanto en mesocarpo externo como en la columela a lo largo de toda la ontogenia y durante la maduración del fruto kiwi (Figuras 3.19, 3.20 y 3.22). *AdARF1* y *AdARF/XYL1*, putativamente codificantes de las enzimas α -Ara y α -Ara/ β -Xil en kiwi, se expresan –con escasas excepciones– durante toda la ontogenia y durante todos los ensayos de postcosecha. Estos patrones de expresión de *AdARF1* y *AdARF/XYL1* no se observan exclusivamente en kiwi: recientemente se encontraron patrones similares en durazno (Di Santo et al., 2009), en frutilla (Rosli et al., 2009) y en tomate (Itai et al., 2003), aunque con diferencias en cuanto a los niveles de acumulación de transcritos de cada especie y variedad en particular. Por su parte, *AdPL1* resultó ser un gen putativamente codificante de la enzima PL, cuya expresión se produce en momentos muy precisos de la ontogenia del kiwi: en la expansión celular que ocurre luego de la multiplicación en la Fase I, y en la Fase IV de maduración, con expresión ligera en mesocarpo externo en el Estadio 1 (día 175) y, principalmente, en el Estadio 3 de ablandamiento del mesocarpo. Llamativamente, en columela se expresa durante los Estadios 2 y 3, aunque con expresión máxima coincidente con el pico de etileno. Los genes *AdEXP1* y *AdEXP2* son putativamente codificantes de Exp. Yang et al. (2007) solamente indicaron que *AdEXP1* y *AdEXP2* de kiwi se expresan durante la maduración del fruto. Esta Tesis establece que ambos genes se expresan tanto en el crecimiento como en la maduración, y tanto en el mesocarpo externo como en la columela (Figura 3.19, 3.20). Consecuentes con su función aparente, las mayores acumulaciones de sus transcritos se verifican en los momentos de expansión celular (sobre todo en la Fase I y III de la ontogenia) y en la maduración (Fase IV), particularmente en los Estadios 1 y 3. Llamativamente, *AdEXP1* se expresa, en mayor o menor grado, en todas las fases –tanto en mesocarpo externo como en columela–. En cambio, en la columela, *AdEXP2* sólo se expresa durante la Fase IV de la maduración. La expresión destacada de ambos genes en los Estadios 1 y 3 sugiere fuertemente su papel en el hinchamiento de la pared celular que, en el caso del kiwi, se verifica tanto in vivo como in vitro. Por ello, es posible su intervención en el debilitamiento de las interacciones glicano-glicano –interactuando en la interfase celulosa-glicanos de matriz– y/o en la solubilización de las pectinas que precede a su despolimerización.

3) Como objetivo 3 se planteó el estudio de la modulación de la expresión de los genes de β -Gal, α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp en kiwi, bajo diferentes condiciones de manejo en postcosecha (exposición o no al etileno y al 1-MCP). A partir de ese objetivo se formuló la hipótesis 3, a saber: “la expresión de los genes codificantes de β -Gal, α -Ara/ β -Xil, α -Ara, PL y Exp podría resultar modulada por diferentes reguladores del crecimiento (etileno y 1-MCP) durante el ablandamiento del kiwi”. Esta hipótesis es aceptada en general para los genes codificantes de β -Gal, PL y Exp debido a los resultados obtenidos en el experimento 7, no así para los genes codificantes de α -Ara/ β -Xil y α -Ara. En efecto, *AdARF1* y *AdARF/XYL1* muestran una variación muy pobre de sus expresiones ante la aplicación de etileno y 1-MCP (Figura 3.24) lo que permite aseverar que se tratan de genes cuya regulación es independiente del etileno. En cambio, *AdGAL1* muestra una rápida respuesta a la presencia de etileno (3-6 h) y una prácticamente nula presencia de transcriptos ante la aplicación de 1-MCP, lo que sugiere que su expresión es dependiente del etileno (Figura 3.24). *AdPL1* se expresa fuertemente 24 h después de la aplicación de etileno, y no manifiesta acumulación de transcriptos ante la aplicación de 1-MCP (Figura 3.24). Esto permite suponer que se trata de un gen al menos parcialmente dependiente del etileno. Finalmente, se verifica una importante acumulación de transcriptos de *AdEXPI* en solo 3 h (Figura 3.24). La expresión de este gen en respuesta a la aplicación de etileno también fue verificada por Yang et al (2007), quienes registraron incrementos en los niveles de expresión a partir de las 6 h. La modulación positiva y extremadamente rápida por etileno y la inhibición de su expresión por 1-MCP probada en esta Tesis permite calificar a *AdEXPI* como un gen altamente sensible al etileno y habilita la suposición de que la expresión de este gen es al menos parcialmente dependiente del etileno, ya que también se expresa en momentos de la ontogenia en que la biosíntesis de etileno es prácticamente nula.

Las hipótesis planteadas en esta Tesis permitieron evaluar en forma conjunta el efecto del 1-MCP y algunas modulaciones importantes producidas por el etileno, no solo en referencia a la maduración en general, sino también a nivel de la pared celular del kiwi en particular.

5.2. Contribuciones de esta Tesis: relevancia para el estado actual del conocimiento

A continuación se resumen los principales aportes de esta Tesis al conocimiento del crecimiento, maduración y ablandamiento de los kiwis.

El tratamiento con 1-MCP, efectuado inmediatamente después de la cosecha, retarda notablemente el ablandamiento del kiwi e inhibe la producción de etileno. No obstante, la magnitud de estos efectos es altamente dependiente de la región de cultivo. Por lo tanto, resultan esperables diferentes respuestas a la aplicación de esta tecnología de postcosecha, dependiendo de los factores del cultivo. En razón de ello, la aplicación de 1-MCP debe ajustarse según las características propias del producto obtenido en cada región/monte frutal. Los kiwis, conservados a 0 °C durante 40, 80 o 120 d, y luego tratados a 0 °C con 1-MCP y transferidos a 20 °C para su almacenamiento, muestran una inhibición de la producción de etileno y el concomitante aplazamiento del ablandamiento durante su maduración a 20 °C. La efectividad del 1-MCP es más baja a medida que los frutos se ablandan, pero el kiwi todavía desencadena una respuesta al 1-MCP en estadios muy avanzados de pérdida de firmeza (10-15 N), lo cual habilita su inclusión entre los frutos de mejor respuesta al 1-MCP. El 1-MCP bloquea ampliamente los incrementos en los niveles de los transcritos de *KWACS1* y *KWACO1*, relacionados con la maduración de kiwis que previamente fueron expuestos o no a condiciones de bajas temperaturas. Esto sugiere la existencia de una regulación positiva de la producción de etileno. El 1-MCP retrasa la pérdida de firmeza en frutos de diferentes estadios de maduración pero no inhibe completamente el ablandamiento. De este modo, las aplicaciones de 1-MCP con las concentraciones adecuadas pueden ser una herramienta útil en todos los casos, ya que no alteran la calidad del fruto en términos de una retención excesiva de la firmeza. Por otra parte, el 1-MCP acredita ser una herramienta valiosa para identificar factores dependientes y no dependientes del etileno en cualquier estadio del proceso de ablandamiento del kiwi.

Fases de crecimiento y desarrollo		Evento relacionado al metabolismo de la pared celular	Expresión génica potencialmente vinculada al evento
Fase I: Multiplicación celular		Expansión inicial de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> • Expresión de <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> (esta Tesis) • Aumento de expresión de <i>AdPL1</i> (esta Tesis)
Fase II: 'Plateau'		Disminución de la tasa de expansión de la pared celular Posible reorganización de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> • Caída de expresión de <i>AdEXP2</i> (esta Tesis) • Ligera expresión de <i>AdGAL1</i> (esta Tesis)
Fase III: Crecimiento rápido		Crecimiento rápido del mesocarpio	<ul style="list-style-type: none"> • Expresión de <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> (esta Tesis)
Fase IV: Maduración	Estadio 1	Degradación de almidón	<ul style="list-style-type: none"> • Genes vinculados con el metabolismo del almidón (Atkinson et al., 2011)
		Relajación de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada expresión de <i>AdEXP1</i> y <i>AdEXP2</i> (esta Tesis)
		Pérdidas de galactosa y arabinosa en maduración	<ul style="list-style-type: none"> • <i>AdGAL1</i> (esta Tesis) • <i>AdARF1</i> (esta Tesis)
		Elevada metildesterificación de pectinas	<ul style="list-style-type: none"> • El gen codificante de un inhibidor de la PME podría interrumpir la desterificación al expresarse por acción del etileno (Atkinson et al., 2011)
	Estadio 2	Continuación, a tasa menor, de la relajación de la pared celular Degradación de pectinas solubles y reducción del PM de los xiloglucanos	<ul style="list-style-type: none"> • Caída de expresión de <i>AdEXP1</i>, <i>AdEXP2</i> (esta Tesis) • <i>CkPGC</i> (Wang et al., 2000) • Gen codificante de xilanasa (Atkinson et al., 2011)
	Estadio 3	Producción de etileno endógeno Dilatación máxima de la pared celular, masiva solubilización de pectinas, despolimerización de poliuronidos y pérdida de galactosa; pérdida de la lámina media y desintegración de la pared celular	<ul style="list-style-type: none"> • <i>KWACS1</i>, <i>KWACO1</i> (Whittaker et al., 1997; Xu et al., 2000; esta Tesis) • <i>AdEXP1</i>, <i>AdEXP2</i> (Yang et al., 2007; esta Tesis) • <i>CkPGA</i>, <i>CkPGB</i>, <i>CkPGC</i> (Wang et al., 2000; Atkinson et al., 2011) • <i>AdGAL1</i> (esta Tesis) • <i>AdPL1</i> (esta Tesis)

Cuadro 5.1 Vinculación entre las distintas fases del crecimiento y desarrollo del kiwi, algunos eventos metabólicos de su pared celular y la expresión de genes potencialmente relacionados.

Previo clonación total o parcial de los genes *AdGAL1*, *AdARF1*, *AdARF/XYL1* y *AdPL1* vinculados al metabolismo de la pared celular, a los que se sumó la evaluación de *AdEXP1* y *AdEXP2*, esta Tesis procedió a la ampliación del conocimiento de la expresión génica relativa a dicha pared, explicando en parte los hechos que tienen lugar en las fases I, II y III del crecimiento y varios efectos observados durante las distintas etapas de la maduración (todo lo cual fue ampliamente discutido en el capítulo 4 y resumido en el Cuadro 5.1). Además, utilizando las ventajas operativas que ofrece el 1-MCP en kiwi, se enfocó la posible regulación del etileno de los distintos genes estudiados, ampliando significativamente el estado del conocimiento al presente (Cuadro 5.2). Visiblemente, esta Tesis alcanzó excelentes resultados en la detección de potenciales genes de pared dependientes del etileno, entre los que se destacan *AdEXP1*, *AdEXP2* y *AdGAL1* (Cuadro 5.2), como se detalló en la discusión.

Gen	Tiempo de exposición al etileno hasta la expresión del gen (h)	Referencia
<i>AdEXP1</i>	3	Esta Tesis
<i>AdEXP2</i>	3	Esta Tesis
<i>AdGAL1</i>	3 (trazas), 6 (máximo)	Esta Tesis
<i>PG (EST260725)</i>	12	Atkinson et al. (2011)
<i>AdPL1</i> y EST245817	24	Esta Tesis y Atkinson et al. (2011)
PMEi (EST191682)	24	Atkinson et al. (2011)
Xilosidasa (EST228432)	168	Atkinson et al. (2011)
Glucanasa (EST310095)	168	Atkinson et al. (2011)

Cuadro 5.2 Estado del conocimiento de la posible dependencia del etileno de genes vinculados a la pared celular.

AdGAL1 es el primer gen clonado putativamente codificante de β -Gal en kiwi. Su expresión podría ser al menos parcialmente responsable de las grandes pérdidas de galactosa que experimenta la pared celular del kiwi, y los resultados obtenidos en esta Tesis justifican estudios posteriores más exhaustivos. *AdARF1* y *AdARF/XYL1* podrían vincularse con el metabolismo de la arabinosa (despolimerización y síntesis de novo) que ocurre en la pared celular durante su desarrollo. *AdPL1* es un gen putativamente codificante de la enzima PL, los momentos de su expresión, particularmente durante el ablandamiento, sugieren su participación en la despolimerización de las pectinas, que ocurre con mayor intensidad en el Estadio 3 de la maduración. *AdEXP1* y *AdEXP2* son genes putativamente codificantes de Exp cuya expresión se enlaza (particularmente en

el caso de *AdEXP2*) con los ciclos de expansión y relajación de la pared celular. En conjunto, los resultados de la presente Tesis han permitido establecer una aproximación de los potenciales agentes causales de los sucesivos cambios que experimenta la pared celular antes y durante la producción autocatalítica del etileno y el alcance de su dependencia de esta fitohormona gaseosa.

5.3. Perspectivas

A diferencia de lo que sucede en otros frutos, la demostración en esta Tesis de que el ablandamiento del kiwi puede ser bloqueado cuando el fruto alcanza la madurez de consumo permite prever la extensión del tiempo de comercialización antes que el fruto torne en sobremaduro. Así, esta Tesis confirma al 1-MCP como una herramienta excelente por su facilidad de uso y su versatilidad, que además posibilitará un análisis mucho más exhaustivo de los procesos de maduración organoléptica del kiwi.

Durante la escritura de esta Tesis, Atkinson et al. (2011) mostraron resultados promisorios con una línea transgénica de kiwi antisentido para la enzima ACO. Los autores señalaron que una de las líneas obtenidas no produce etileno detectable. En esa línea se observan dos etapas del ablandamiento: un primer y segundo estadio en los cuales el ablandamiento rápido del fruto no resulta bloqueado, y un tercer estadio en el cual, bloqueada la síntesis autocatalítica de etileno, el ablandamiento resulta fuertemente inhibido. Sin embargo, esta Tesis mostró que el 1-MCP, inhibidor de la acción del etileno, resulta eficiente en la inhibición del ablandamiento también en los primeros estadios de rápida caída de la firmeza. Esto plantea a futuro un interrogante sobre los alcances precisos del bloqueo de la ACO en los kiwis transgénicos, particularmente por la muy elevada sensibilidad del kiwi al etileno. A partir del trabajo de Atkinson et al. (2011) y de esta Tesis, no quedan dudas de que el etileno juega un papel determinante en la etapa final del ablandamiento del kiwi. Sin embargo, a partir del uso del 1-MCP, esta Tesis plantea un nuevo desafío: que el fruto no sólo es sensible al etileno desde el primer estadio de maduración, sino que es el etileno el que sincroniza y eventualmente acelera la maduración desde sus inicios (aún antes de la producción de etileno autocatalítico), mientras que su bloqueo completo inhibe la maduración en esa etapa preclimática, contradiciendo parcialmente lo hallado por Atkinson et al. (2011).

Finalmente, esta Tesis no sólo permitió avances originales en temas básicos relativos a la fisiología del desarrollo y del ablandamiento del kiwi, la expresión de genes asociados y su modulación por etileno y 1-MCP. La elucidación de la capacidad del 1-MCP de prolongar la vida en postcosecha del kiwi, incluso con niveles avanzados de ablandamiento, constituye un desarrollo de aplicación tecnológico-industrial con perspectivas únicas para la comercialización del producto ya que, empleado bajo los protocolos especificados, el 1-MCP permite extender de forma sustantiva el almacenamiento del kiwi una vez alcanzadas las condiciones organolépticas (sabor, aroma y firmeza) óptimas para su consumo, es decir, sin detrimento de su calidad.

BIBLIOGRAFIA

- Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E. 1992. Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. Academic Press, San Diego. 414 pp.
- Adams, D.O., Yang, S.F. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 170-174.
- Alexander, L., Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53: 2039-2055.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Amodio, M.L., Colelli, G., Hasey, J.K., Kader, A.A. 2007. A comparative study of composition and postharvest performance of organically and conventionally grown kiwifruits. *J. Sci. Food Agric.* 87: 1228-1236.
- Antunes, M.D.C., Sfakiotakis, E.M. 2000. Effect of high temperature stress on ethylene biosynthesis, respiration and ripening of 'Hayward' kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 251-259.
- Antunes, M.D.C., Sfakiotakis, E.M., 2002. Chilling induced ethylene biosynthesis in 'Hayward' kiwifruit following storage. *Sci. Hort.* 92: 29-39.
- Antunes, M.D.C., Pateraki, I., Kanellis, A.K., Sfakiotakis, E.M. 2000. Differential effects of low-temperature inhibition on the propylene induced autocatalysis of ethylene production, respiration and ripening of 'Hayward' kiwifruit. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 75: 575-580.
- Antunes, M.D.C., Dandlen, S., Cavaco, A.M., Miguel, G.A. 2010. Effects of postharvest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6173-6181.
- Arpaia, M.L., Mitchell, F.G., Kader, A.A. 1994. Postharvest physiology and causes of deterioration. En: Hasey, J.K., Johnson, R.S., Grant, J.A., Reil, W.O. (Eds.), *Kiwifruit Growing and Handling*. ARN Publications, University of California, Davis, CA, USA, pp. 88-93.
- Arpaia, M.L., Mitchell, F.G., Kader, A.A., Mayer, G. 1985. Effects of 2% O₂ and varying concentrations of CO₂ with or without C₂H₄ on the storage performance of kiwifruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110: 200-203.

- Atkinson, R.G., Cipriani, G., Whittaker, D.J., Gardner, R.C. 1997. The allopolyploid origin of kiwifruit, *Actinidia deliciosa* (Actinidiaceae). *Pl. Syst. Evol.* 205: 111-124.
- Atkinson, R.G., Gunaseelan, K., Wang, M.Y., Luo, L., Wang, T., Norling, C.L., Johnston, S.L., Maddumage, R., Schröder, R., Schaffer, R.J. 2011. Dissecting the role of climacteric ethylene in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) ripening using an 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase knockdown line. *J. Exp. Bot.*, en prensa. Publicado on-line el 21 de abril de 2011.
- Ayala-Zavala, J.F., Wang, S.Y., Wang, C.Y., Gonzales-Aguilar, A.G. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebens. -Wiss. Technol.* 37: 687-695.
- Bal, E., Kok, D. 2009. Effects of UV-C treatment on kiwifruit quality during the storage period. *J. Central Eur. Agric.* 10: 375-382.
- Beldman, G., Schols, H.A., Pitson, S.M., Searle-van Leeuwen, M.J.F., Voragen, A.G.J. 1997. Arabinans and arabinan degrading enzymes. En: Sturgeon, R.J. (Ed.), *Advances in Macromolecular Carbohydrate Research*, Vol 1. Jai Press, Greenwich, Connecticut, EE.UU., pp 1-64.
- Belfield, E.J., Ruperti, B., Roberts, J.A., McQueen-Mason, S.J. 2005. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J. Exp. Bot.* 56: 817-823.
- Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M.L., Moyano, E., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J. 2003. Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.* 54: 633-645.
- Bennett, A.B., Labavitch, J.M. 2008. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Sci.* 175: 130-136.
- Blankenship, S.M., Dole, J.M. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28: 1-25.
- Bonghi, C., Pagni, S., Vidrih, R., Ramina, A., Tonutti, P. 1996: Cell wall hydrolases and amylase in kiwifruit softening. *Postharvest Biol. Technol.* 9: 19-29.
- Boquete, E.J., Trinchero, G.D., Frascina, A.A., Vilella, F., Sozzi, G.O. 2004. Ripening of 'Hayward' kiwifruit treated with 1-methylcyclopropene after cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 57-65.
- Brummell, D.A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33: 103-119.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality

- and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47: 311-340.
- Brummell, D.A., Lashbrook, C.C., Bennett, A.B. 1994. Plant endo-1,4- β -D-glucanases: structure, properties and physiological function. En: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society Symposium Series 566, American Chemical Society, New York, USA, pp. 100-129.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., Civello, P.M., Palys, J.M., Bennett, A.B., Dunsmuir, P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Cell* 11: 2203-2216.
- Brummell, D.A., Dal Cin, V., Crisosto, C.H., Labavitch, J.M. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* 55: 2029-2039.
- Calvo, G., Sozzi, G.O. 2004. Improvement of postharvest storage quality of 'Red Clapp's' pears by treatment with 1-methylcyclopropene at low temperature. *J. Hort. Sci. Biotech.* 79: 930-934.
- Carpita, N., McCann, M. 2000. The cell wall. En: *Biochemistry & molecular biology of plants*. Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.) American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA, pp. 52-108.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Chang, C., Stadler, R. 2001. Ethylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. *BioEssays* 23: 619-627.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B., Meyerowitz, E.M. 1993. *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544.
- Chen, F., Bradford, K.J. 2000. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol.* 124: 1265-1274.
- Chen, Y-F, Etheridge, N, Schaller, G.E. 2005. Ethylene signal transduction. *Ann. Bot.* 95: 901-915.
- Chiaromonti, N., Barboni, T. 2010. Relationship between the parameters physicochemical and the ethylene emission during cold storage of kiwifruits. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45: 1513-1516.
- Choi, D., Cho, H.T., Lee, Y. 2006. Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiol. Plant.* 126: 511-518.

- Ciardiello, M.A., D'Avino, R., Amoresano, A., Tuppo, L., Carpentieri, A., Carratore, V., Tamburrini, M., Giovane, A., Pucci, P., Camardella, L. 2008. The peculiar structural features of kiwi fruit pectin methylesterase: amino acid sequence, oligosaccharides structure, and modeling of the interaction with its natural proteinaceous inhibitor. *Proteins* 71: 195-206.
- Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A., Bennett, A.B. 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* 121: 1273-1279.
- Colelli, G., Amodio, M.L. 2003. Effetti del trattamento con 1-MCP di frutti di actinidia interi e a fette. *Riv. Frutticoltura. Ortofloricolt.* 65: 61-68.
- Collmer, A., Keen, N.T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 383-409.
- Cosgrove, D.J. 1997a. Relaxation in a high-stress environment: the molecular basis of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9: 1031-1041.
- Cosgrove, D.J. 1997b. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 171-201.
- Cosgrove, D.J. 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 391-417.
- Cosgrove, D.J. 2000a. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326.
- Cosgrove, D.J. 2000b. New genes and new biological roles for expansins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 73-78.
- Cosgrove, D.J. 2003. Expansion of the plant cell wall. En: Rose, J.K.C. (Ed), *The Plant Cell Wall*. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, pp. 237-263.
- Cosgrove, D.J., Bedinger, P., Durachko, D.M. 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 6559-6564.
- Crisosto, C.H., Crisosto, G.M. 2001. Understanding consumer acceptance of early harvested 'Hayward' kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.* 22: 205-213.
- Crisosto, G.U., Mitchell, F.G., Arpaia, M.L., Meyer, G. 1984. The effect of growing location and harvest maturity on the storage performance and quality of 'Hayward' kiwifruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 109: 584-587.
- Crisosto, C.H., Garner, D., Crisosto, G.M., Kaprielian, R.. 1997. Kiwifruit preconditioning protocol. *Acta Hort.* 444: 555-559.
- Dal Cin, V., Rizzini, F.M., Botton, A., Tonutti, P. 2006. The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 42: 125-133.

- Dauny, P.T., Joyce D.C. 2002. 1-MCP improves storability of 'Queen Cox' and 'Bramley' apple fruit. *HortScience* 37: 1082-1085.
- De Lorenzo, G., Cervone, F., Hahn, M.G., Darvill, A., Albersheim, P. 1991. Bacterial endopectate lyase: evidence that plant cell wall pH prevents tissue maceration and increases the half-life of elicitor-active oligogalacturonides. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 335-344.
- Defilippi, B.G., Whitaker, B.D., Hess-Pierce, B.M., Kader AA. 2006. Development and control of scald on wonderful pomegranates during long-term storage. *Postharvest Biol. Technol.* 41: 234-243.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo C.W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Di Santo, M.C., Pagano, E.A., Sozzi, G.O. 2009. Differential expression of α -L-arabinofuranosidase and α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase genes during peach growth and ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 562-569.
- Domingo, C., Roberts, K., Stacey, N.J., Connerton, I., Ruíz-Terán, F., McCann, M.C. 1998. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. *Plant J.* 13: 17-28.
- Domínguez-Puigjaner, E., Llop, I., Vendrell, M., Prat, S. 1997. A cDNA clone highly expressed in ripe banana fruit shows homology to pectate lyases. *Plant Physiol.* 114: 1071-1076.
- El-Sharkawy, I., Jones, B., Li, Z.G., Lelièvre J.M., Pech, J.C., Latché, A. 2003. Isolation and characterization of four ethylene perception elements and their expression during ripening in pears (*Pyrus communis* L.) with/without cold requirement. *J. Exp. Bot.* 54: 1615-1625.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2002. Federal Register 67: 48796-48800.
- Fan, X., Mattheis, J.P. 1999. Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2847-2853.
- Fan, X., Blankenship, S.M., Mattheis, J.P. 1999. 1-Methylcyclopropene inhibits apple ripening. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 124: 690-695.
- Fan, X., Argenta, L., Mattheis, J.P. 2000 Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 135-142.

- Ferguson, A.R. 1999. Kiwifruit cultivars: Breeding and selection. *Acta Hort.* 498: 43-51.
- Ferguson, A.R. 2004. 1904-the year that kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) came to New Zealand. *NZ J. Crop Hort. Sci.* 32: 3-27.
- Ferguson, R. 2008. *Actinidia deliciosa*, kiwifruit. En: Janick, J. y Paull, R.E. (Eds.), *The Encyclopedia of Fruit and Nuts*. CABI Publishing, Oxfordshire, United Kingdom, pp. 1-7.
- Ferguson, A.R., Huang, H. 2007. Genetic resources of kiwifruit: Domestication and breeding. *Hort. Rev.* 33: 1-121.
- Ferguson, I., Volz, R., Woolf, A. 1999. Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 255-262.
- Fonseca, S., Monteiro, L., Barreiro, M.G., Pais, M.S. 2005. Expression of genes encoding cell wall modifying enzymes is induced by cold storage and reflects changes in pear fruit texture. *J. Exp. Bot.* 56: 2029-2036.
- Fry, S. C. 1988. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. Longman, London, United Kingdom & Wiley & Sons, New York, USA. 333 pp.
- Gaete-Eastman, C., Figueroa, C.R., Balbontin, C., Moya, M., Atkinson, R.G., Herrera, R., Moya-Leon, M.A. 2009. Expression of an ethylene-related expansin gene during softening of mountain papaya fruit (*Vasconcellea pubescens*). *Postharvest Biol. Technol.* 53: 58-65.
- Gallego, P.P., Zarra, I. 1997. Changes in cell wall composition and water-soluble polysaccharides during kiwifruit development. *Ann. Bot.* 79: 695-701.
- Gallie, D.R., Young, T.E. 2004. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol. Genet. Genomics* 271: 267-281.
- Gantulga, D., Ahn, Y.O., Zhou, C., Battogtokh, D., David R. Bevan, D.R., Winkel, B.S.J., Esen, A. 2009. Comparative characterization of the Arabidopsis subfamily a1 b-galactosidases. *Phytochemistry* 70: 1999-2009.
- Giovannoni, J.J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 725-749.
- Giovannoni, J.J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16 (Suppl.): S170-S180.
- Goulao, L.F., Oliveira, C.M. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends Food Sci. Technol.* 19: 4-25.

- Goulao, L.F., Santos, J., de Souza, I., Oliveira, C.M. 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biol. Technol.* 43:307-318.
- Goulao, L.F., Cosgrove, D.J., Oliveira, C.M. 2008. Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples. *Postharvest Biol. Technol.* 48: 37-51.
- Gray-Mitsumune, M., Mellerowicz, E.J., Abe, H., Schrader, J., Winzell, A., Sterky, F., Blomqvist, K., McQueen-Mason, S., Teeri, T.T., Sundberg, B. 2004. Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the alpha-expansin gene family. *Plant Physiol.* 135: 1552-1564.
- Gross, K.C.; Sams, C.E. 1984. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* 23: 2457-2461.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr. Res.* 23: 1719-1726.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hall, B.P., Shakeel, S.N., Schaller, G.E. 2007. Ethylene receptors: ethylene perception and signal transduction. *J. Plant Growth Regul.* 26: 118-130.
- Hallett, I.C., MacRae, E.A., Wegrzyn, T.F. 1992. Changes in kiwifruit cell wall ultrastructure and cell packing during postharvest ripening. *Int. J. Plant Sci.* 153: 49-60.
- Hao, Y., Huang, X., Mei, X., Li, R., Zhai, Z., Yin, S., Huang, Y., Luo, Y. 2008. Expression, purification and characterization of pectin methylesterase inhibitor from kiwi fruit in *Escherichia coli*. *Protein Expres. Purif.* 60: 221-224.
- Harker, F.R., Redgwell, R.J., Hallett, I.C., Murray, S.H. 1997. Texture of fresh fruit. *Hort. Rev.* 20: 121-224.
- Harman, J.E., McDonald, B. 1989. Controlled atmosphere storage of kiwifruit. Effect on fruit quality and composition. *Sci. Hort.* 37: 303-315.
- Harris, P.J. 2005. Diversity in plant cell walls. En: Henry, R.J. (Ed.), *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants*. CAB International Publishing, Wallingford, United Kingdom, pp. 201-227.
- Harris, D.R., Seberry, J.A., Wills, R.B.H., Spohr, L.J. 2000. Effect of fruit maturity on efficiency of 1-methylcyclopropene to delay the ripening of bananas. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 303-308.

- Harrison, E.P., McQueen-Mason, S.J., Manning, K. 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *J. Exp. Bot.* 52: 1437-1446.
- Hayama, H., Shimada, T., Haji, T., Ito, A., Kashimura, Y., Yoshioka, H. 2000. Molecular cloning of a ripening-related expansin cDNA in peach: evidence for no relationship between expansin accumulation and change in fruit firmness during storage. *J. Plant Physiol.* 157: 567-573.
- Hayama, H., Ito, A., Moriguchi, T., Kashimura, Y. 2003. Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. *Postharvest Biol. Technol.* 29: 1-10.
- Hayama, H., Shimada, T., Fujii, H., Ito, A., Kashimura, Y. 2006. Ethylene regulation of softening and softening-related genes in peach. *J. Exp. Bot.* 57: 4071-4077.
- Henrissat, B. 1998. Glycosidase families. *Biochemical Society Transactions.* 26:153-156.
- Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y., 2003a. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54: 771-779.
- Hiwasa, K., Rose, J.K.C., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2003b. Differential expression of seven alpha-expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiol. Plant.* 117: 564-572.
- Hoeberichts, F.A., Van der Plas, L.H.W., Woltering, E.J. 2002. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 26: 125-133.
- Ikoma, Y., Yano, M., Xu, Zh.Ch., Ogawa, K. 1998. Reduction in ethylene synthesis in parthenocarpic *Actinidia deliciosa* fruit induced by *N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea. *Postharvest Biol. Technol.* 13: 121-129.
- Ikoma, Y., Yano, M., Xu, Z.C., Ogawa, K. 1999. Isolation of a cDNA encoding active protein for kiwifruit ACC synthase and its specific expression in the outer pericarp. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 68: 286-288.
- Ishimaru, M., Smith D.L., Gross K.C., Kobayashi, S. 2007. Expression of three expansin genes during development and maturation of Kyoho grape berries. *J. Plant Physiol.* 164: 1675-1682.
- Itai, A., Ishihara, K., Bewley, J.D. 2003. Characterization of expression, and cloning, of β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54: 2615-2622.

- Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., Mercado, J.A. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* 128: 751-759.
- Kader, A.A. 1988. Influence of preharvest and postharvest environment on nutritional composition of fruits and vegetables. En: Quebedeaux, B., Bliss, F.A. (Eds.), *Horticulture and Human Health: Contributions of Fruits and Vegetables. Proceedings of the 1st International Symposium on Horticulture and Human Health*, Upper Saddle River, New Jersey. Prentice Hall, USA, pp. 18–32.
- Kader, A.A. 1997. A summary of CA requirements and recommendations for fruits other than apples and pears. En: Kader, A.A. (Eds.), *CA '97. Fruits Other than Apples and Pears. Proceedings Seventh International Control Atmosphere Research Conference. July 13-18, 1997. University of California, Davis. CA, USA, Vol. 3: 1–34.*
- Kader, A.A. 2002. Fruits in the global market. En: Knee, M. (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, United Kingdom, pp. 1-16.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 44: 283-307.
- Kende, H., Bradford, K.J., Brummell, D.A., Cho, H.T., Cosgrove, D.J., Fleming, A.J., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S., Rose, J.K.C., Voesenek, L. 2004. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol. Biol.* 55: 311–314.
- Kim, H.O., Hewett, E.W., Lallu, N. 1999. The role of ethylene in kiwifruit softening. *Acta Hort.* 498: 255-262.
- Kim, H.O., Hewett, E.W., Lallu, N. 2001. Softening and ethylene production of kiwifruit reduced with 1-methylcyclopropene. *Acta Hort.* 553: 167-170.
- Knox, J.P. 2008. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 308-313.
- Kobayashi, T., Hatada, Y., Higaki, N., Lusterio, D.D., Ozawa, T., Koike, K., Kawai, S., Ito, S. 1999. Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Biochim. Biophys. Acta* 1427: 145-154.
- Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft rot *Erwinias*. *Annu. Rev. Phytopath.* 25: 405-430.
- Koukounaras, A., Sfakiotakis, E. 2007. Effect of 1-MCP prestorage treatment on ethylene and CO₂ production and quality of 'Hayward' kiwifruit during shelf-life after short, medium and long term cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 46: 174-180.

- Kulikauskas, R., McCormick, S. 1997. Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato. *Plant Mol. Biol.* 34: 809-814.
- Kurahashi, T., Matsumoto, T., Itamura, H. 2005. Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene absorbent on softening and shelf life of dry ice-treated Japanese persimmon 'Saijo' harvested at various maturation stages. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 74: 63-67.
- Lashbrook, C.C., Tieman, D.M., Klee, H.J. 1998. Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant J.* 15: 243-252.
- Lee, S.K., Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 207-220.
- Lelievre, J.M., Latche, A., Jones, B., Bouzayen, M., Pech, J.C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plant.* 101: 727-739.
- Letunic, I., Copley, R.C., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J., Bork, P. 2006. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucl. Acids Res.* 34: D257-D260.
- Li, X., Nakagawa, N., Nevins, D.J., Sakurai, N. 2006. Changes in the cell wall polysaccharides of outer pericarp tissues of kiwifruit during development. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 115-124.
- Li, X., Xu, C., Korban, S.S., Chen, K. 2010. Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29: 222-243.
- Lippert, F., Blanke, M.M. 2004. Effect of mechanical harvest and timing of 1-MCP application on respiration and fruit quality of European plums. *Postharvest Biol. Technol.* 34: 305-311.
- Lurie, S. 2002. Temperature management. En: Knee, M. (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, United Kingdom, pp. 107-121.
- MacRae, E., Redgwell, R. 1992. Softening in kiwifruit. *Postharvest News Inf.* 3: 49N-52N.
- MacRae, E.A., Bowen, J.H., Stec, M.G.H. 1989. Maturation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) from two orchards: differences in composition of the tissue zones. *J. Sci. Food Agric.* 47: 401-416.
- Manolopoulou, H., Papadopoulou, P.A. 1998. Study of respiratory and physico-chemical changes of four kiwi fruit cultivars during cool-storage. *Food Chem.* 63: 529-534.
- Marcus, S.E., Blake, A.W., Benians, T.A.S., Lee, K.J.D., Poyser, C., Donaldson, L., Leroux, O., Rogowski, A., Petersen, H.L., Boraston, A., Gilbert, H.J., Willats,

- W.G.T., Knox, J.P. 2010. Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *Plant J.* 64: 191-203.
- Marín-Rodríguez, M.C., Orchard, J., Seymour, G.B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53: 2115-2119.
- Marín-Rodríguez, M.C., Smith, D.L., Manning, K., Orchard J., Seymour, G.B. 2003. Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol.* 51: 851-857.
- Mathooko, F.M., Kubo Y., Inaba, A., Nakamura, R. 1995. Characterization of the regulation of ethylene biosynthesis in tomato fruit by carbon dioxide and diazocyclopentadiene. *Postharvest Biol. Technol.* 5: 221-233
- Matsumoto, S., Obara, T., Luh, B.S. 1983. Changes in chemical constituents of kiwifruit during post-harvest ripening. *J. Food Sci.* 48: 607-611.
- Mattheis, J.P., Fellman, J.K. 1999. Preharvest factors influencing flavor of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 227-232.
- Mbégué-A-Mbégué, D., Gouble, B., Gomez, R.M., Audergon, J.M., Albagnac, G., Fils-Lycaon, B. 2002. Two expansin cDNAs from *Prunus armeniaca* expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 445-452.
- McDonald, B., Harman, J.E. 1982. Controlled-atmosphere storage of kiwifruit. I. Effect on fruit firmness and storage life. *Sci. Hort.* 17: 113-123.
- McMurchie, E.J., McGlasson, W.B., Eaks, I.L. 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237: 235-236.
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J. 1994. Disruption of hydrogen-bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6574-6578.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.
- Medina-Escobar, N., Cárdenas, J., Moyano, E., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J. 1997. Cloning, molecular characterisation and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol. Biol.* 34: 867-877.
- Medina-Suárez, R., Manning, K., Fletcher, J., Aled, J., Bird, C.R., Seymour, G.B. 1997. Gene expression in the pulp of ripening bananas. *Plant Physiol* 115: 453-461.
- Menniti, A.M., Gregori, R., Donati, I. 2005. Effect of 1-methylcyclopropene on kiwifruit softening. *Acta Hort.* 682: 2095-2099.

- Menniti, A.M., Donati, I., Gregori, R. 2006. Responses of 1-MCP application in plums stored under air and controlled atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 243-246.
- Milioni, D., Sado, P.-E., Stacey, N.J., Domingo, C., Roberts, K., McCann, M.C. 2001. Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system. *Plant Mol. Biol.* 47: 221-238.
- Mir, N., Beaudry, R. 2002. Atmosphere control using oxygen and carbon dioxide. En: Knee, M. (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, United Kingdom, pp. 122-156.
- Mir, N.A., Curell, E., Khan, N., Whitaker, M., Beaudry, R.M. 2001. Harvest maturity, storage temperature, and 1-MCP application frequency alter firmness retention and chlorophyll fluorescence of 'Redchief Delicious' apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126: 618-624.
- Mwaniki, M.W., Mathooko, F.M., Matsuzaki, M., Hiwasa, K., Tateishi, A., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2005. Expression characteristics of seven members of the β -galactosidase gene family in "La France" pear (*Pyrus communis* L.) fruit during growth and their regulation by 1-methylcyclopropene during postharvest ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 36: 253-263.
- Mworia, E.G. Yoshikawa, T., Yokotani, N., Fukuda, T., Suezawa, K., Ushijima, K., Nakano, R., Kubo, Y. 2010. Characterization of ethylene biosynthesis and its regulation during fruit ripening in kiwifruit, *Actinidia chinensis* 'Sanuki Gold'. *Postharvest Biol. Technol.* 55:108-113.
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A. 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol.* 118: 1295-1305.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.
- Nishiyama, I. 2007. Fruits of the *Actinidia* genus. *Adv. Food Nutr. Res.* 52: 293-324.
- Nishiyama, I., Yamashita, Y., Yamanaka, M., Shimohashi, A., Fukuda, T., Oota, T. 2004. Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other *Actinidia* species. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5472-5475.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J.K.C., Kubo, Y., Bennett, K.A., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latche, A., Pech, J.-C., Bennett,

- A.B. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *J. Exp. Bot.* 58: 1281-1290.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., Palva, E.T. 2000. Interacting signal pathways control defense gene expression in *A. thaliana* in response to cell walldegrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 430-438.
- Nunan, K.J., Davies, C., Robinson, S.P., Fincher, G.B. 2001. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* 214: 257-264.
- O'Neill, M., York, W.S. 2003. The composition and structure of plant primary cell walls. Rose, J.K.C. (Ed.), *The Plant Cell Wall*. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, pp. 1-54.
- Ogawa, H., Fukumoto, H., Yano, T., Yanamoto, K., Tochikura, T. 1990. Purification and characterisation of β -galactosidase from kiwifruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 298-305.
- Okuse, I., Ryugo, K. 1981. Compositional changes in the developing 'Hayward' kiwifruit in California. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106: 73-76.
- Othman, R., Chong, H.L., Choo, T.S., Ali, Z.M. 2011. Three β -galactosidase cDNA clones related to fruit ripening in papaya (*Carica papaya*). *Acta Physiol. Plant.*, en prensa.
- Pang, J.H., Ma, B., Sun, H-J., Ortiz, G.I., Imanishi, S., Sugaya, S., Gemma, H., Ezura, H. 2007. Identification and characterization of ethylene receptor homologs expressed during fruit development and ripening in persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.). *Postharvest Biol. Technol.* 44: 195-203.
- Paterson, V.J., MacRae, E.A., Young, H. 1991. Relationships between sensory properties and chemical composition of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *J. Sci. Food Agric.* 57: 235-251.
- Payasi, A., Misra, P.C., Sanwal, G.G. 2004. Effect of phytohormones on pectate lyase activity in ripening *Musa acuminata*. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 861-865.
- Pennycook, S.R., Manning, M.A. 1992. Picking wound curing to reduce Botrytis storage rot of kiwifruit. *N. Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 20: 357-360.
- Percy, A.E., O'Brien, I.E.W., Jameson, P.E., Melton, L.D., MacRae, E.A., Redgwell, R.J. 1996. Xyloglucan endotransglycosylase activity during fruit development and ripening of apple and kiwifruit. *Physiol. Plant.* 96: 43-50.
- Pezzotti, M., Feron, R., Mariani, C. 2002. Pollination modulates expression of the PPAL gene, a pistil-specific beta-expansin. *Plant Mol. Biol.* 49: 187-197.
- Ponce, N.M.A., Ziegler, V.H., Stortz, C.A., Sozzi, G.O. 2010. Compositional changes in

- cell wall polysaccharides from Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) during growth and on-tree ripening. *J. Agric. Food Chem.* 58: 2562-2570.
- Pratt, H.K., Reid, M.S. 1974. Chinese gooseberry: seasonal patterns in fruit growth and maturation, ripening, respiration and the role of ethylene. *J. Sci. Food Agric.* 25: 747-757.
- Pua, E.-C., Ong, C.-K., Liu, P., Liu J.-Z. 2001. Isolation and expression of two pectate lyase genes during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*). *Physiol. Plant.* 113: 92-99.
- Raffo, M.D., Sánchez, E.E., Sozzi, G.O. 2008. Exposure to direct sunlight during the growing season delays postharvest softening of 'Williams' pears and improves their response to 1-methylcyclopropene. *Acta Hort.* 800: 1035-1040.
- Rasori, A., Ruperti, B., Bonghi, C., Tonutti, P., Ramina, A. 2002. Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *J. Exp. Bot.* 53: 2333-2339.
- Redgwell, R.J., Fischer, M. 2002. Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perception. En: Knee, M. (Ed.), *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, United Kingdom, pp. 46-88.
- Redgwell, R.J., Fry, S.C. 1993. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinida delciosa*) ripening. Implications for fruit softening. *Plant Physiol.* 103: 1399-1406.
- Redgwell, R.J., Harker, R. 1995. Softening of kiwifruit discs: effect of inhibition of galactose loss from cell walls. *Phytochemistry* 39: 1319-1323.
- Redgwell, R.J., Percy, A.E. 1992. Cell wall changes during on-vine softening of kiwifruit. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 20: 453-456.
- Redgwell, R.J., Melton, L.D., Brasch, D.J. 1990. Cell wall changes in kiwifruit following postharvest ethylene treatment. *Phytochemistry* 29: 399-407.
- Redgwell, R.J., Melton, L.D.; Brasch, D.J. 1992. Cell wall dissolution in ripening kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of the pectic polymers. *Plant Physiol.* 98: 71-81.
- Redgwell, R.J., MacRae, E., Hallett, I., Fischer, M., Perry, J., Harker, R. 1997a. In vivo and in vitro swelling of cell walls during fruit ripening. *Planta* 203: 162-173.
- Redgwell, R.J., Fischer, M., Kendal, E., MacRae, E.A. 1997b. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203: 174-181.
- Reinhardt, D., Wittwer, F., Mandel, T., Kuhlemeier, C. 1998. Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell* 10: 1427-1437.

- Ritenour, M.A., Crisosto, C.H., Garner, D.T., Cheng, G.W., Zoffoli, J.P. 1999. Temperature, length of cold storage and maturity influence the ripening rate of ethylene-preconditioned kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 107-115.
- Rose, J.K.C., Lee, H.H., Bennett, A.B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 5955-5960.
- Rose, J.K.C.; Catalá, C.; Gonzalez-Carranza, Z.H.; Roberts, J.A. 2003. Cell wall disassembly. En: Rose, J.K.C. (Ed.), *The Plant Cell Wall*. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, pp. 264-324.
- Rosli, H.G., Civello, P.M., Martinez, G.A. 2009. α -L-Arabinofuranosidase from strawberry fruit: cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 272-281.
- Ross, G.S., Redgwell, R.J., MacRae, E.A. 1993. Kiwifruit β -galactosidase: isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharides. *Planta* 189: 499-506.
- Ross, C.S., Wegrzyn, T., MacRae, E.A., Redgwell, R.J. 1994. Apple β -galactosidase. Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol.* 106: 521-528.
- Saha, B.C. 2000. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18: 403-423.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.G., Chang, C., Medrano, L.J., Bleecker, A.B., Meyerowitz, E.M. 1998. *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 5812-5817.
- Saladié, M., Matas, A.J., Isaacson, T., Jenks, M.A., Goodwin, S.M., Niklas, K.J., Xiaolin, R., Labavitch, J.M., Shackel, K.A., Fernie, A.R., Lytovchenko, A., O'Neill, M.A., Watkins, C.B., Rose, J.K.C. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol.* 144: 1012-1028.
- Salinger, M.J., Kenny, G.J., Morley-Bunker, M.J. 1993. Climate and kiwifruit cv. Hayward. 1. Influences on development and growth. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 21: 235-245.
- Saltveit, M.E. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 279-292.
- Salvador, A., Arnal, L., Monterde, A., Cuquerella, J. 2004. Reduction of chilling injury symptoms in persimmon fruit cv. 'Rojo Brillante' by 1-MCP. *Postharvest Biol. Technol.* 33: 285-291.

- Salvador, A., Arnal, L., Carot, J.M., Carvalho, C.P., Jabaloyes, J.M. 2006. Influence of different factors on firmness and color evolution during the storage of persimmon cv. 'Rojo Brillante'. J. Food Sci. 71: S169-S175.
- Sampedro, J., Cosgrove, D.J., 2005. The expansin superfamily. Genome Biol. 6: art. 242.
- Sams, C.E. 1999. Preharvest factors affecting postharvest texture. Postharvest Biol. Technol. 15: 249-254.
- Sane, V.A., Chourasia, A., Nath, P. 2005. Softening in mango (*Mangifera indica* cv. dashehari) is correlated with the expression of an early ethylene responsive, ripening-related expansin gene, MiExpA1. Postharvest Biol. Technol. 38: 223-230.
- Santiago-Doménech, N., Jiménez-Bemúdez, S., Matas, A.J., Rose, J.K.C., Muñoz-Blanco, J., Mercado, J.A., Quesada, M.A. 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening. J. Exp. Bot. 59: 2769-2779.
- Sato-Nara, K., Yuhashi, K-I., Higashi, K., Hosoya, K., Kubota, M., Ezura, H. 1999. Stage- and tissue-specific expression of ethylene receptor homolog genes during fruit development in muskmelon. Plant Physiol. 119: 321-329.
- Schröder, R., Atkinson, R.G. 2006. Kiwifruit cell walls: towards an understanding of softening? New Zeal. J. Forestry Sci. 36: 112-129.
- Schröder, R., Atkinson, R.G., Langenkämper, G., Redgwell, R.J. 1998. Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. Planta 204: 242-251.
- Schöder, R., Wegrzyn, T.F., Bolitho, K.M., Redgwell, R.J. 2004. Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. Planta 219: 590-600.
- Sisler, E.C. 2006. The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level. Biotechnol. Adv. 24: 357-367.
- Sisler, E.C. y Blankenship, S.M. 1993. Diazocyclopentadiene (DACP), a light sensitive reagent for the ethylene receptor in plants. Plant Growth Regul. 12: 125-132.
- Sisler, E.C., Blankenship S.M. 1996. Methods of counteracting an ethylene response in plants. U.S. Patent 5518988
- Sisler, E.C., Serek, M. 1997. Inhibitors of ethylene response in plants at the receptor level: recent developments. Physiol. Plant. 100: 577-582.
- Smith, D.L., Gross, K.C., 2000. A family of at least seven B-galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. Plant Physiol. 123: 1173-1183.
- Smith, D.L., Starret, D.A., Gross, K.C. 1998. A gene coding for tomato fruit B-galactosidase II is expressed during fruit ripening: cloning, characterization, and

- expression pattern. *Plant Physiol.* 117: 417-423.
- Smith, D. L., Abbott, J.A., Gross, K.C. 2002. Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol.* 129: 1755-1762.
- Solano, R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J.R. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVES and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Gene. Dev.* 12: 3703-3714.
- Sozzi, G.O. 2004. Strategies for the regulation of postharvest fruit softening by changing cell wall enzyme activity. En: Dris, R., Mohan Jain, S. (eds.), *Production Practices and Quality Assessment of Food Crops, Vol 4: Postharvest Treatments and Technology*. Kluwer Academic Publishers B.V., Dordrecht, The Netherlands, pp. 135-172.
- Sozzi, G.O. 2007a. Fisiología del crecimiento de los frutos. En: Sozzi, G.O. (Ed.), *Árboles Frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento*. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, pp. 307-330.
- Sozzi, G.O. 2007b. Fisiología de la maduración de los frutos. En: Sozzi, G.O. (Ed.), *Árboles Frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento*. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, pp. 667-687.
- Sozzi, G.O., Beaudry, R.M. 2007. Current perspectives on the use of 1-methylcyclopropene in tree fruit crops: an international survey. *Stewart Postharvest Rev.* 3 (2): 1-16 (16).
- Sozzi, G.O., Camperi, S.A., Cascone, O., Fraschina, A.A. 1998. Galactosidases in tomato fruit ontogeny: decreased galactosidase activities in antisense ACC synthase fruit during ripening and reversal with exogenous ethylene. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 237-244.
- Sozzi, G.O., Trinchero, G.D., Fraschina, A.A. 1999. Controlled-atmosphere storage of tomato fruit: low oxygen or elevated carbon dioxide levels alter galactosidase activity and inhibit exogenous ethylene action. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1065-1070.
- Sozzi, G.O., Greve, L.C., Prody, G.A., Labavitch, J.M. 2002. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate α -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. *Plant Physiol.* 129: 1330-1340.
- Stec, M.G.H., Hodgson, J.A., MacRae, E.A., Triggs, C.M. 1989. Role of fruit firmness in the sensory evaluation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv Hayward). *J. Sci. Food Agric.* 47: 417-433.

- Sun, L., van Nocker, S. 2010. Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 10: 152. 13 pp.
- Sutherland, P., Hallet, I., Redgwell, R., Benhamou, N., MacRae, E. 1999. Localization of cell wall polysaccharides during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening. *Int. J. Plant Sci.* 160: 1099-1109.
- Taglienti, A., Massantini, R., Botondi, R., Mencarelli, F., Valentini, M. 2009. Postharvest structural changes of Hayward kiwifruit by means of magnetic resonance imaging spectroscopy. *Food Chem.* 114: 1583-1589.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24: 1596-1599 (<http://www.kumarlab.net/publications>).
- Taniguchi, Y., Ono, A., Sawatani, M., Nanba, M., Kohno, K., Usui, M., Kurimoto, Matuhasi, M. T. 1995. *Cry j* I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has a pectate lyase enzyme activity. *Allergy* 50: 90-93.
- Tateishi, A., Kanayama, Y., Yamaki, S. 1996. α -L-Arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. *Phytochemistry* 42: 295-299.
- Tateishi, A., Inoue, H., Yamaki, S. 2001a. Fluctuations in activities of three β -galactosidase isoforms from ripening avocado (*Persea americana*) fruit and their different activities against its cell wall polysaccharides as substrates. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 70: 586-592.
- Tateishi, A., Inoue, H., Shiba, H., Yamaki, S., 2001b. Molecular cloning of β -galactosidase from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) and its gene expression with fruit ripening. *Plant Cell Physiol.* 42:492-498.
- Tateishi, A., Mori, H., Watari, J., Nagashima, K., Yamaki, S., Inoue, H. 2005. Isolation, characterization, and cloning of α -L-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of Japanese pear. *Plant Physiol.* 138: 1653-1664.
- Tateishi, A., Shiba, H., Ogihara, J., Isobe, K., Nomura, K., Watanabe, K., Inoue, H. 2007. Differential expression and ethylene regulation of β -galactosidase genes and isozymes isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 45: 56-65.
- Tatsuki, M., Endo, A., Ohkawa, H. 2007. Influence of time from harvest to 1-MCP treatment of apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biol. Technol.* 43: 28-35.

- Tavarini, S., Degl'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R., Guidi, L. 2008. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of 'Hayward' kiwifruit. *Food Chem.* 107: 282-288.
- Tavarini, S., Degl'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R., Guidi, L. 2009. Polygalacturonase and β -galactosidase activities in Hayward kiwifruit as affected by light exposure, maturity stage and storage time. *Sci. Hort.* 120: 342-347.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Tieman, D.M., Handa, A.K. 1996. Tomato product quality from transgenic fruits with reduced pectin methylesterase. *J. Food Sci.* 61: 85-108.
- Theologis, A. 1992. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70: 181-184.
- Thompson, J.D., Higgins, D.J., Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thompson, J.F., Brecht, P.E., Hinsch, T., Kader, A.A. 2000. Marine Container Transport of Chilled Perishable Produce. *Agriculture and Natural Resources. Publication 21595.* University of California, Oakland, CA, 32 pp.
- Toivonen, P.M.A., Lu, C. 2005. Studies on elevated temperature, short-term storage of 'Surise' Summer apples using 1-MCP to maintain quality. *J. Hort. Sci. Biotech.* 80: 439-446.
- Tonini, G., Brigati, S., Caccioni, D. 1989. CA storage of kiwifruit: influence on rots and storability. *Proceedings Fifth International Control Atmosphere Research Conference.* June 14-16, 1989. Wenatchee, WA, Vol. 2: 69-76.
- Trainotti, L., Zanin, D., Casadoro, G. 2003. A cell wall-oriented genomic approach reveals a new and unexpected complexity of the softening in peaches. *J. Exp. Bot.* 54: 1821-1832.
- Trincherro, G.D., Sozzi, G.O., Covatta, F., Fraschina, A.A. 2004. Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene extends postharvest life of 'Bartlett' pears. *Postharvest Biol. Technol.* 32: 193-204.
- Trivedi, P.K., Nath, P. 2004. MaExp1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit. *Plant Sci.* 167: 1351-1358.
- Valero, D., Martinez-Romero, D., Valverde, J.M., Guillen, F., Serrano, M. 2003. Quality improvement and extension of shelf life by 1-methylcyclopropene in plum as affected by ripening stage at harvest. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 4: 339-348.
- Varner, J.E., Lin, L.S. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell.* 56: 231-239.

- Verhertbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Verhoef, R., Schols, H.A., McCleary, B.V., McKee, L., Gilbert, H.J., Knox, J.P. 2009. Developmental complexity of arabinan polysaccharides and their processing in plant cell walls. *Plant J.* 59: 413-425.
- Vicente, A.R., Saladie, M., Rose, J.K.C., Labavitch, J.M. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *J. Sci. Food Agric.* 87: 1435-1448.
- Vilas-Boas, E.V.B., Kader, A.A. 2007. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on softening of fresh-cut kiwifruit, mango and persimmon slices. *Postharvest Biol. Technol.* 43: 238-244.
- Villalobos-Acuña, M., Mitcham, E.J. 2008. Ripening of European pears: The chilling dilemma. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 187-200.
- Vincken, J.-P., Schols, H.A., Oomen, R.J.F.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, R.G.F. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132: 1781-1789.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., Giovannoni, J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*Rin*) locus. *Science* 296: 343-346.
- Wang, Z.-Y., MacRae, E.A., Wright, M.A., Bolitho K.M., Ross, G.S., Atkinson, R.G. 2000. Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Mol. Biol.* 42: 317-328.
- Watkins, C.B. 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnol. Adv.* 24: 389-409.
- Watkins, C.B. 2008. Overview of 1-methylcyclopropene trials and uses for edible horticultural crops. *HortScience* 43: 86-94.
- Watkins, C.B., Nock, J.F. 2005. Effects of delays between harvest and 1-methylcyclopropene treatment, and temperature during treatment, on ripening of air-stored and controlled-atmosphere-stored apples. *HortScience* 40: 2096-2101.
- Watkins, C.B., Nock, J.F., Whitaker, B.D. 2000. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 19: 17-32.
- Wegrzyn, T.F.; MacRae, E.A. 1992. Pectinesterase, polygalacturonase, and β -galactosidase during softening of ethylene-treated kiwifruit. *HortScience* 27: 900-902.

- Whittaker, D.J., Smith, G.S., Gardner, R.C. 1997. Expression of ethylene biosynthetic genes in *Actinidia chinensis* fruit. *Plant Mol. Biol.* 34: 45-55.
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H-C., Giovannoni, J.J., Klee, H.J. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 270: 1807-1809.
- Wills, R.B.H., Ku, V.V.V. 2002. Use of 1-MCP to extend the time to ripen of green tomatoes and postharvest life of ripe tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 26: 85-90.
- Wing, R.A., Yamaguchi, J., Larabell, S.K., Ursin, V.M., Mc-Cormick, S. 1989. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol. Biol.* 14: 17-28.
- Woolf, A.B., Requejo-Tapia, C., Cox, K.A., Jackman, R.C., Gunson, A., Arpaia, M.L., White, A. 2005. 1-MCP reduces physiological storage disorders of 'Hass' avocados. *Postharvest Biol. Technol.* 35: 43-60.
- Wu, Z., Burns, J.K. 2004. A β -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of "Valencia" orange (*Citrus sinensis*). *J. Exp. Bot.* 1-8.
- Xu, Z.C., Ikoma, Y., Yano, M., Ogawa, K., Hyodo, H. 1998. Varietal differences in the ability to produce ethylene and gene expression of ACC synthase and ACC oxidase between 'Kui mi' and 'Hong xin' of Chinese kiwifruit. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 67: 204-209.
- Xu, Z.C., Hyodo, H., Ikoma, Y., Yano, M., Ogawa, K. 2000. Relation between ethylene-producing potential and gene expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* fruits. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 69: 192-194.
- Xu, C.G., Nakatsuka, A., Kano, H., Itamura, H. 2003. Changes in ethylene production and activities of cell wall degrading enzymes during rapid fruit softening of Japanese persimmon 'Saijo'. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 72: 460-462.
- Yang, S.L., Xu, C.J., Zhang, B., Li, X., Chen, K.S. 2007. Involvement of both subgroups A and B of expansin genes in kiwifruit fruit ripening. *HortScience* 42: 315-319.
- Yau, C.P., Wang, L., Yu, M., Zee, S.Y., Yip, W.K. 2004. Differential expression of three genes encoding an ethylene receptor in rice during development, and in response to indole-3-acetic acid and silver ions. *J. Exp. Bot.* 55: 547-556.

- Yin, X.R., Chen, K.S., Allan, A.C., Wu, R.M., Zhang, B., Lallu, N., Ferguson, I.B. 2008. Ethylene-induced modulation of genes associated with the ethylene signalling pathway in ripening kiwifruit. *J. Exp. Bot.* 59: 2097-2108.
- Yin, X.R., Allan, A.C., Zhang, B., Wu, R.M., Burdon, J., Wang, P., Ferguson, I.B., Chen, K.S. 2009. Ethylene-related genes show a differential response to low temperature during 'Hayward' kiwifruit ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 52: 9-15.
- Yin, X.R., Allan, A.C., Chen, K., Ferguson, I.B. 2010. Kiwifruit *EIL* and *ERF* genes involved in regulating fruit ripening. *Plant Physiol.* 153: 1280-1292.
- Yoder, M.D., Keen, N.T., Jurnak, F. 1993. New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* 260: 1503-1507.
- Yoshioka, H., Kashimura, Y., Kaneko, K. 1995. β -D-Galactosidase and α -L-arabinofuranosidase activities during the softening of apples. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 63: 871-878.
- Yuan, S., Wu, Y., Cosgrove, D.J. 2001. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. *Plant Physiol.* 127: 324-333.